



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS TREVISAN FRANÇA DE LIMA

EFEITOS ANTITUMORAIS DO L-CARVONE SOBRE CÂNCER DE MAMA *IN VIVO*
E *IN VITRO*

CURITIBA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS TREVISAN FRANÇA DE LIMA

EFEITOS ANTITUMORAIS DO L-CARVONE SOBRE CÂNCER DE MAMA *IN VIVO*
E IN VITRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edneia A. S. R. Cavalieri
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.

(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Lima, Lucas Trevisan França de
Efeitos antitumorais do L-carvone sobre câncer de mama *in vivo* e *in vitro*. / Lucas Trevisan França de Lima. – Curitiba, 2019.
90 p.: il.

Orientadora: Edneia A. S. R. Cavalieri
Coorientadora: Giseli Klassen

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Câncer 2. Metástase 3. Produtos naturais I. Título II. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos, 1981- III. Klassen, Giseli, 1966- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 616.99449

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUCAS TREVISAN FRANÇA DE LIMA** intitulada: **Efeitos antitumorais do L-carvone sobre câncer de mama *in vivo* e *in vitro***, sob orientação da Profa. Dra. EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2019.



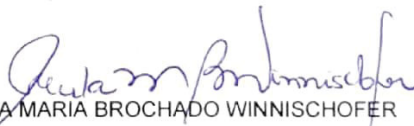
EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SILVIO MARQUES ZANATA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar, acima de tudo, o meu mais profundo agradecimento a todos que tornaram esta pesquisa possível. Ao longo desses anos de jornada científica (da iniciação científica ao mestrado), pude perceber que a ciência não se faz sozinho e que o desenvolvimento científico é o resultado de um esforço conjunto.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof^a. Edneia A. S. R. Cavalieri, pela dedicação, pelo carinho, pelos ensinamentos e pela confiança demonstradas nesses quatro anos. Tenho certeza que grande parte de todo meu processo de amadurecimento e desenvolvimento como cientista devo a ela.

Aos meus pais, Claudio e Karla, e à minha irmã, Gabriela, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar, servindo como um verdadeiro porto seguro. Obrigado pelo estímulo constante e por nunca permitirem que eu desanimasse, nada disso seria possível sem vocês.

À Carolina, pelo carinho, por estar ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldades, pelo apoio e pelo incentivo ao longo desses anos.

À Prof^a. Giseli Klassen, por abrir as portas do laboratório e pela disponibilidade em contribuir com todo o seu conhecimento e experiência para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Andressa, Claudinha e Regiane, sempre presentes, seja para discutir os resultados de experimentos ou para “jogar conversa fora”. Vocês tornaram meus dias mais felizes!

Aos meus amigos, Guilherme, Matheus Augusto e Eduardo (Zé), pela parceria de longa data, e também aos amigos agregados ao longo desses anos de graduação, Fernanda, Rafael, Luana, Mariana, Renata e Mayara (Mc), agradeço pela companhia e pelas “fugidinhas” para um chazinho entre um experimento e outro.

Aos amigos e colegas com os quais eu convivi, mesmo que brevemente, no laboratório durante os meus anos de mestrado, Felipe, Angie, Amani, Laís, Julia e Verônica, e especialmente ao Fernando, por sempre se demonstrar solícito e animado para ajudar com os experimentos.

À Prof^a. Célia Regina, pela ajuda com os experimentos e, principalmente, por me mostrar uma forma positiva de encarar a vida.

À Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A disseminação metastática de tumores de um local primário para outros órgãos é a responsável por 90% das mortes entre pacientes oncológicos. A escassez de tratamentos eficientes para este estágio da doença leva às diversas pesquisas na busca de agentes com potencial antimetastático e que tenham menores efeitos colaterais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral do monoterpene L-carvone no câncer de mama *in vitro* utilizando as linhagens tumorais MCF7 e MDAMB-231; e *in vivo* utilizando o modelo tumoral de mama murinho de Ehrlich. *In vitro*, o tratamento com o composto reduziu a viabilidade celular concentração e tempo-depende, com IC₅₀ de 670,8 nM para a MCF7 e 550,2 nM para a MDAMB-231. As células expostas a 100 nM de L-carvone por 48 horas apresentaram menor capacidade de adesão ao colágeno e à fibronectina, principalmente através da regulação negativa de integrina $\beta 1$ e da inibição da ativação da quinase de adesão focal (FAK), evidenciado por imunofluorescência e *western blotting*. O tratamento também mostrou a diminuição da invasão nas células em relação aos controles, estando esse efeito relacionado a diminuição da expressão gênica, proteica e atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2). *In vivo*, o L-carvone (25 mg/kg) diminuiu significativamente o crescimento do tumor e a combinação do monoterpene com metotrexato (MTX) potencializou a eficiência do quimioterápico. A análise histológica dos tumores evidenciou aumento da necrose no grupo L-carvone, mas não nos grupos MTX e combinação, indicando um possível efeito sobre a angiogênese tumoral, que foi confirmada *in vitro* através da quantificação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e imunodeteção do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α), indicando a inibição da via pró-angiogênica. Portanto, esses resultados sugerem o L-carvone como possível adjuvante no tratamento do câncer através da modulação de diversos processos relacionados a metástase.

Palavras-chave: Metástase. Produtos naturais. Invasão. Angiogênese.

ABSTRACT

Metastatic spread of tumors from a primary site to other organs accounts for 90% of deaths among cancer patients. The scarcity of efficient treatments for this stage of the disease leads to several researches looking for agents with anti-metastatic potential and that have less side effects to normal cells. The aim of this study was to evaluate the antitumor potential of the natural monoterpene L-carvone against breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the treatment of MCF7 and MDAMB-231 breast tumor cell lines with the compound reduced the cells viability in a concentration and time-dependent manner, with an IC₅₀ of 670.8 nM for MCF7 and 550.2 nM for MDAMB-231. Cells exposed to 100 nM L-carvone for 48 hours were less able to adhere to collagen and fibronectin, mainly by the down-regulation of β 1 integrin and the inhibition of focal adhesion kinase (FAK) activation, evidenced by immunofluorescence and western blot. Treatments with L-carvone also lead to a reduction in cell invasion compared to control, and this effect was related to decreased matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) gene expression, protein expression and activity. *In vivo*, L-carvone (25 mg/kg) significantly decreased Ehrlich tumor growth and the combination of this monoterpene with methotrexate (MTX) enhanced the efficiency of chemotherapy. Histological analysis of tumors showed increased necrosis in the L-carvone group, but not in the MTX and combination groups, indicating a possible effect on tumor angiogenesis, which was confirmed *in vitro* by quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) and immunodetection of hypoxia-induced factor 1 (HIF-1 α), indicating the inhibition of the pro-angiogenic pathway. Therefore, these results suggest L-carvone as a possible adjuvant in cancer treatment through the modulation of several metastasis-related processes.

Keywords: Metastasis. Natural Products. Invasion. Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	19
FIGURA 2 – PROTEÍNAS DO COMPLEXO DE ADESÃO FOCAL.....	22
FIGURA 3 – ATIVAÇÃO DE FAK POR CLUSTER DE INTEGRINAS.....	23
FIGURA 4 – ESTRUTURA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	25
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CARVONE.....	30
FIGURA 6 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	46
FIGURA 7 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO POR CRISTAL VIOLETA.....	47
FIGURA 8 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE O CICLO CELULAR.....	48
FIGURA 9 – ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS EXPOSTAS A L-CARVONE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	49
FIGURA 10 – MARCAÇÃO DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	50
FIGURA 11 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA AOS COMPONENTES COMUNS DA MEC.....	53
FIGURA 12 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	54
FIGURA 13 – – ENSAIO D E INVASÃO EM TRANSWELL DA LINHAGEM MDA-MB-231 EXPOSTA A L-CARVONE.....	55
FIGURA 14 – RT-qPCR DE GENES RELACIONADOS AO CÂNCER EM CÉLULAS TUMORAIS EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	57
FIGURA 15 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM MCF7 EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	58
FIGURA 16 – IMUNOMARCAÇÃO DE INTEGRINA β 1 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	60
FIGURA 17 – EXPRESSÃO DE INTEGRINA β 1, FAK E pFAK NAS CÉLULAS TRATADAS COM L-CARVONE.....	61
FIGURA 18 – EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 EM NA LINHAGEM MDAMB-231 EXPOSTA AO L-CARVONE	62
FIGURA 19 – VOLUME E PESO DOS TUMORES DE EHRlich EM ANIMAIS TRATADOS COM L-CARVONE.....	64
FIGURA 20 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TUMORES.....	67

FIGURA 21 – RT-qPCR DE GENES RELACIONADOS AO CÂNCER NO TUMOR DE EHRLICH.....	68
FIGURA 22 – QUANTIFICAÇÃO DE VEGF POR ELISA E IMUNODETECÇÃO DE HIF.....	69
FIGURA 23 – MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA O L-CARVONE NAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SANGUE.....	65
TABELA 2 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS E MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS VEÍCULO E TRATADOS COM L-CARVONE.....	66
TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 CÂNCER	14
2.1.2 O Câncer de Mama	15
2.1.3 Classificações do câncer de mama	16
2.2 ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER.....	18
2.3 EVENTOS MOLECULARES RELACIONADOS AS METÁSTASES	18
2.3.1 Adesão celular mediada por integrinas.....	20
2.3.2 Sinalização mediada por FAK	22
2.3.3 Mecanismo de Invasão Tumoral.....	24
2.3.4 Processo de Angiogênese Tumoral.....	27
2.4 PRODUTOS NATURAIS	28
2.4.1 Compostos Terpenos	29
2.4.2 O monoterpeno L-carvone (ou R-(-)-carvone)	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
4.1.1 Linhagens Tumerais	34
4.1.2 Ensaio de Viabilidade pelo método de MTT	34
4.1.3 Curva de Proliferação	35
4.1.5 Ensaio de Migração Celular.....	36
4.1.6 Ensaio de Adesão Celular	36
4.1.7 Ensaio de Invasão Celular.....	37
4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS ...	37
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
4.2.2 Imunodeteção de Proteínas.....	38

4.2.3 Análise da Atividade Gelatinolítica por Zimografia	39
4.2.4 Imunofluorescência	40
4.2.5 Marcação do Citoesqueleto	40
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA	41
4.4 PCR EM TEMPO REAL.....	42
4.5 ENSAIOS IN VIVO	42
4.5.1 Modelo Tumoral de Erlich.....	42
4.5.2 Análise Histopatológica dos Tumores.....	43
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE VEGF POR ELISA.....	44
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DO L-CARVONE	46
5.2 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR L-CARVONE.....	48
5.3 INFLUÊNCIA DO L-CARVONE SOBRE AS DINÂMICAS CELULARES EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA	52
5.3.1 Ensaio de adesão celular	52
5.3.2 Ensaio de migração celular	53
5.3.3 Ensaio de invasão celular <i>transwell</i>	55
5.4 EFEITOS DO L-CARVONE SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A METÁSTASE	56
5.5 EFEITO DO L-CARVONE NA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA.....	57
5.6 INFLUÊNCIA DO L-CARVONE SOBRE A SINALIZAÇÃO DE INTEGRINA ..	59
5.7 REGULAÇÃO DE MMP-2 EM CÉLULAS EXPOSTAS AO L-CARVONE.....	62
5.8 EFEITOS ANTITUMORAIS DO L-CARVONE <i>IN VIVO</i>	63
5.8.1 Crescimento tumoral.....	63
5.8.2 Parâmetros hematológicos e peso dos órgãos.....	64
5.8.3 Análise histológica	65
5.8.4 Avaliação da expressão gênica nos tumores	67
5.9 AVALIAÇÃO DE SINAIS PRÓ-ANGIOGÊNICOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	69
6 DISCUSSÃO	71

7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO I.....	88
ANEXO II.....	89

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tumor maligno diagnosticado com mais frequência em mulheres tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, compreendendo cerca de 30% de todos os cânceres e 15% das mortes relacionadas à doença globalmente (SIEGEL; MILLER, 2019). No Brasil, estima-se o surgimento de 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2018-2019, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer. Destes casos, 59.700 correspondem a neoplasias de mama, o que equivale a 29,5% do total de novos casos para o sexo feminino, ocupando o segundo lugar entre os tipos de câncer de maior incidência (INCA, 2018).

O surgimento de um tumor ocorre quando as células normais adquirem modificações genéticas, epigenéticas e bioquímicas que as conferem vantagens em relação a células normais, como a evasão da morte celular, maiores taxas de proliferação e desregulação do metabolismo energético. Ainda, essas células passam a se relacionar de forma diferente com o tecido adjacente, formando um microambiente tumoral que promova a progressão do câncer, por exemplo, através de reações inflamatórias, estímulo da angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (MEC) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto, sabe-se que cerca de 90% das mortes associadas ao câncer de mama ocorrem em decorrência de metástases, que consistem na disseminação de células tumorais para regiões distantes do tumor primário (CHAFFER; WEINBERG, 2011). A metástase é um processo de várias etapas que envolvem a disseminação de células do tumor primário, seguido de adesão, migração e invasão na corrente sanguínea ou vasos linfáticos, extravasamento dos vasos e colonização dos tecidos-alvo (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Aproximadamente 80% dos diagnósticos de câncer de mama ocorrem no estágio não-metastático da doença, quando o tumor ainda se encontra limitado ao seu local de origem (WAKS; WINER, 2019). Nesta fase, as estratégias terapêuticas consistem na cirurgia para a ressecção do tumor e/ou linfonodos axilares, associada ou não a radioterapia, e na administração sistêmica de quimioterápicos ou terapias hormonais neoadjuvantes (antes da cirurgia) ou pós-operatórias (DAWOOD *et al.*, 2011). Para o câncer metastático, entretanto, o objetivo do tratamento é o prolongamento da vida da paciente e a palição dos sintomas da doença, uma vez

que os tratamentos quimioterápicos não são eficientes. Neste caso, a taxa de sobrevida das pacientes pode variar de 10 meses a 5 anos, de acordo com o subtipo molecular do tumor (WAKS, AGW; WINER, 2019). Um dos problemas recorrentes no tratamento de metástases é a aquisição de resistência tumoral, principalmente devido à heterogeneidade tumoral, o que ocasiona a perda da eficiência ao longo do tratamento e, frequentemente, requer o uso de doses mais elevadas ou da combinação de diversos agentes terapêuticos simultaneamente (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012; MIGNANI *et al.*, 2014). Estes tratamentos, entretanto, possuem uma especificidade limitada para as células tumorais e estão associados aos efeitos adversos, tais como perda de cabelos, náuseas, mielossupressão, neutropenia, astenia, entre outros (WAKS, AGW; WINER, 2019).

Tendo em vista este cenário complexo e ainda não completamente elucidado, diversos estudos buscam identificar moléculas capazes de modular ou inibir as metástases, dentre as quais se destacam os produtos de origem natural. Segundo a agência regulatória americana FDA (do inglês, *Food and Drugs Administration*), dois terços dos fármacos utilizados no tratamento do câncer são produtos naturais ou derivados (MITRA, SARMISTHA; DASH, 2018). Uma classe de compostos que se destaca quanto ao potencial antitumoral é a dos terpenos, biomoléculas produzidos por plantas, geralmente voláteis e com diversas atividades biológicas (TETALI, 2019).

O L-carvone (ou R-(-)-carvone), um monoterpeneo oxigenado, está presente principalmente em óleos essenciais de hortelã (*Mentha spicata*). Este composto apresenta atividades biológicas já relatadas, dentre elas antimaníaca (NOGOCEKE *et al.*, 2016), antimicrobiana (MCGEADY; WANSLEY; LOGAN, 2002) e de depressão do sistema nervoso central (DE SOUSA *et al.*, 2007). No tratamento do câncer, o L-carvone apresentou efeitos antitumorais contra células tumorais de mama *in vitro* (PATEL; THAKKAR, 2014). Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por esta ação antitumoral não foram elucidados, assim como não existem evidências da ação antineoplásica deste composto *in vivo*.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antitumoral do L-carvone *in vitro* e *in vivo*, utilizando linhagens celulares de câncer de mama e o modelo de adenocarcinoma mamário de Ehrlich em camundongos, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O termo câncer é utilizado para denominar o conjunto de mais de 100 patologias que possuem em comum a proliferação desordenada das células (INCA, 2018). O câncer é responsável por mais de 9 milhões de óbitos e 18 milhões de novos diagnósticos anualmente ao redor do mundo, constituindo um problema de saúde pública e global (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se o aparecimento de 27 milhões de novos casos da doença durante o período de 2015 a 2030, acarretando em 17 milhões de mortes (OMS, 2007). Os padrões de distribuição dos casos de câncer pelo globo são influenciados por fatores socioeconômicos, principalmente o limite do acesso da população a saúde e o nível de desenvolvimento do país. Em países desenvolvidos (Europa Ocidental, América do Norte, Japão, Austrália e Nova Zelândia), são observadas as maiores taxas de incidência da doença. No geral, destacam-se nessas regiões os tipos de câncer associados à urbanização, como o de pulmão, próstata, mama feminina, colo e reto (JEMAL; BRAY & FERLAY, 2011). Nestes países, a taxa de morte vem diminuindo durante as últimas décadas, nas quais foi possível observar uma redução de 2,1 milhões de mortes (SIEGEL; MILLER; AHMEDIN, 2017). Em contrapartida, países em desenvolvimento possuem taxas de incidência menores, porém, apresentam uma incidência expressiva de tipos de câncer associados as infecções (OH; WEIDERPASS, 2014)

No Brasil, estudos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam, para o biênio 2018-2019, o aparecimento de 600 mil novos casos para cada ano. Em homens, os tipos mais frequentes de câncer são de próstata (31,7%), de pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), respectivamente. Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4%) figuraram entre os principais, não sendo contabilizados os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2018).

2.1.2 O Câncer de Mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres, com uma taxa de incidência de 57 casos a cada 100 mil mulheres. Em homens, embora ocorra raramente, corresponde a 1% do total de casos da doença (INCA, 2018). Dentre os diversos fatores de risco já identificados, o sexo feminino, a idade avançada e o histórico familiar apresentam-se como os principais, mas não exclusivos. Nos Estados Unidos, apenas 0,3% dos casos de câncer de mama ocorrem em mulheres com idades entre 20 e 29 anos, enquanto a maior ocorrência é observada após os 55 anos (MILLER *et al.*, 2019). O desenvolvimento de câncer devido a predisposições genéticas compreende de 5% a 10% dos casos, ocorrendo principalmente por transmissão hereditária de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que eleva o risco de câncer em 45 a 65% de acordo com a mutação (FENG *et al.*, 2018a). Diversas síndromes já foram caracterizadas como fatores de risco para o câncer de mama, muitas delas relacionadas a herança de genes com mutações, como a síndrome de Li-Fraumeni (mutação de *TP53*) e a síndrome de Cowden (mutação em *PTEN*) (FENG *et al.*, 2018).

Outros fatores não-genéticos associados à doença são a história reprodutiva e a exposição ao estrogênio ao longo da vida, influenciada, por exemplo, pela menarca precoce, menopausa tardia ou pela utilização de reposição hormonal; hábitos de vida, como o sedentarismo, tabagismo e consumo de álcool; ou ocorrência de outras doenças, tais como obesidade e diabetes (FENG *et al.*, 2018).

Na maioria dos casos, a sintomatologia do câncer de mama se caracteriza pelo surgimento de nódulos indolores nas mamas e/ou axilas, frequentemente acompanhado de edema cutâneo característico (textura semelhante a casca de laranja), ulceração do mamilo, descamação e hiperemia (INCA, 2018). A detecção destas alterações é feita através de exames clínicos e da radiografia de mama (mamografia), o principal método de diagnóstico deste câncer mundialmente (DAWOOD *et al.*, 2011). Até 80% das alterações na mama identificadas por exame de imagens são classificadas como benignas, entre elas os fibroadenomas, cisto mamários, papilomas e lipomas, as quais não aumentam significativamente o risco para o desenvolvimento de tumores malignos (GURAY; SAHIN, 2006).

A realização de biópsia orientada por ultrassom é o método de escolha para o diagnóstico de neoplasias da mama. A biópsia pode ser realizada utilizando

agulhas diretamente no *core* da lesão, o método mais utilizado por permitir uma análise mais acurada do tecido. Na presença de microcalcificações, pode-se ainda empregar a punção aspirativa do tecido para a avaliação de características histológicas e moleculares do tumor, assim como a presença de metástases nos linfonodos adjacentes. Em conjunto, as classificações histológicas e moleculares são importantes, pois permitem direcionar estratégias terapêuticas específicas para cada paciente baseadas no tipo tumoral (SANDERINK; MANN, 2017).

2.1.3 Classificações do câncer de mama

Por se tratar de uma doença complexa e heterogênea, as neoplasias de mama apresentam comportamentos biológicos e respostas terapêuticas variadas, podendo ser classificadas quanto a características histológicas e moleculares. A classificação histológica leva em consideração a origem e a extensão do tumor. A mama feminina é formada pelas glândulas produtoras de leite (lóbulos), pelos tubos que transportam o leite (ductos) e pelo tecido conjuntivo, adiposo, vasos sanguíneos e linfáticos (estroma). Desta forma, os carcinomas podem ser classificados em ductais ou lobulares, de acordo com as células epiteliais que deram origem à neoplasia, e em *in situ* ou invasivos, de acordo com a extensão do tumor (FENG *et al.*, 2018a).

Os carcinomas *in situ* abrangem entre 15 e 30% dos diagnósticos de tumores malignos mamários, sendo a maioria destes classificados como carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Estes carcinomas representam o início do processo de progressão tumoral, quando as células epiteliais alteradas se encontram limitadas pelas paredes dos ductos, podendo evoluir, não obrigatoriamente, para as formas invasivas da doença. Os carcinomas invasivos correspondem aos outros 70% a 85% das ocorrências, sendo o carcinoma ductal invasivo (CDI) o mais incidente. Tumores invasivos estão relacionados aos piores prognósticos, pois possuem células capazes de infiltrar o estroma mamário, com ocorrência frequente de disseminação linfática e de metástases ganglionares (CALDARELLA *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2018). Outros fatores também são considerados para o estadiamento do câncer de mama, conhecido como estadiamento TNM por levar em consideração o tamanho e volume tumoral (T), o grau de invasão linfática (N) e metástases (M). Posteriormente a análise destes critérios, estabelece-se um valor de I a IV para determinar o grau de

desenvolvimento da patologia, sendo os graus III e IV considerados estágios avançados da doença (WOODWARD *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, avanços nas técnicas de biologia molecular permitiram a caracterização de quatro principais subtipos moleculares distintos no câncer de mama, que apresentam diferentes taxas de incidência, prognósticos e resposta aos tratamentos. Os principais marcadores moleculares utilizados para a classificação são os receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), detectados por imunohistoquímica, e o fator de crescimento epidermal (HER-2), identificado por imunohistoquímica associada a hibridização *in situ* em casos específicos. Utiliza-se ainda a quantificação do antígeno Ki67, um marcador para proliferação celular, classificado como baixo, quando detectado em menos do que 20% das células tumorais (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011; CALDARELLA *et al.*, 2013). Os subtipos moleculares são: luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2 e basaloide (*basal-like*) (CHEANG *et al.*, 2015) .

Os subtipos luminais correspondem a 75% dos tumores mamários, com características semelhantes a células luminais epiteliais da mama. O luminal A apresenta receptores de estrogênio (RE) e/ou receptores de progesterona (RP), é negativo para HER-2, além de um valor de Ki-67 baixo (<14%). Já o subtipo luminal B apresenta expressão de RE/RP semelhante, entretanto possui uma taxa de proliferação elevada (Ki-67 > 20%) e pode apresentar expressão de HER-2. Em relação ao luminal A, esse subtipo possui os piores prognósticos e graus histológicos maiores. Por possuírem receptores hormonais, células luminais são suscetíveis a terapias hormonais (CHEANG *et al.*, 2015).

O subtipo que superexpressa HER-2 ocorre devido à amplificação do oncogene *HER2/neu* e compreende entre 15 e 20% dos casos. Em geral, estes tumores apresentam um comportamento agressivo e, por não possuírem RE/RP, não respondem a terapias hormonais. No entanto, este cenário vem sendo modificado com a introdução da terapia-alvo, por exemplo, com o uso do anticorpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab (PRAT *et al.*, 2015).

Por último, o subtipo basaloide (*basal-like*) é caracterizado como o mais agressivo, com lesões pouco diferenciadas ou indiferenciadas, altas taxas de proliferação e grau histológico III. Ainda que menos frequente (10-15%), apresenta piores prognósticos e menores taxas de sobrevida. Apesar da nomenclatura, não se originam de células mioepiteliais basais, apenas apresentam um perfil de expressão

similar a elas (ex: citoqueratinas 5, 6 e 14 e EGFR) (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011). Este subtipo compreende os tumores denominados triplo-negativos (RE-, RP-, HER2-), que, por não apresentarem alvos moleculares clássicos de quimioterápicos, terapias hormonais e terapias-alvo, ainda se apresentam como um desafio para o tratamento da doença (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011; PRAT *et al.*, 2015).

2.2 ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER

O câncer surge a partir de alterações genéticas, epigenéticas e bioquímicas em células normais, causando desequilíbrio metabólico, alterando o ciclo celular e gerando uma proliferação desregulada das células. Os gatilhos para o início deste processo podem ser internos, como desequilíbrio hormonal, ou externos, através da exposição a radiação ou aos produtos químicos tóxicos. A partir disto, eventos moleculares levam a ativação de oncogenes, que estimulam a proliferação celular; e a repressão de genes supressores de tumor, que regulam o ciclo celular e a apoptose (ZENG; KYPRIANOU, 2005).

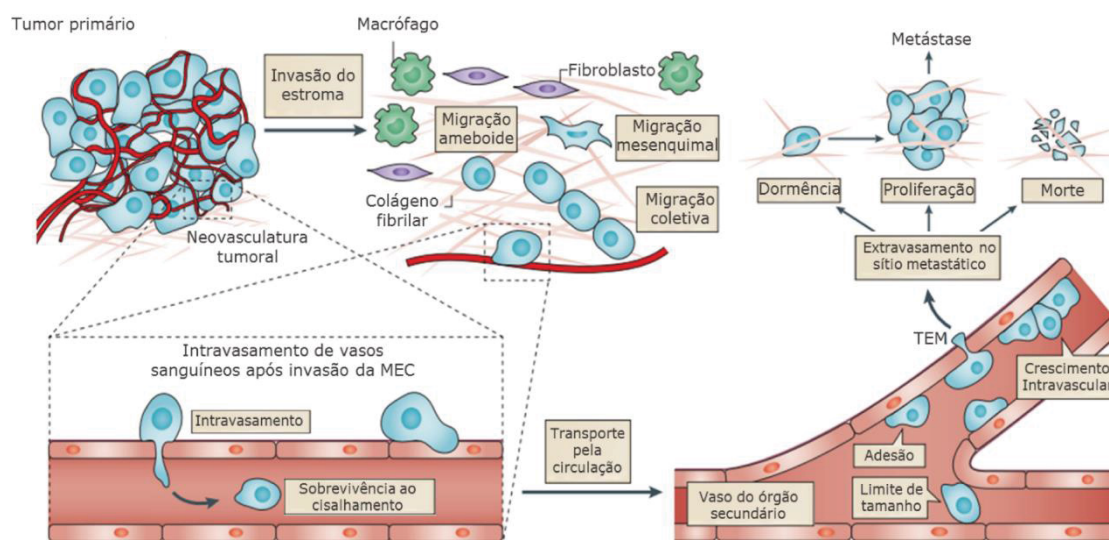
Hanahan e Weinberg (2011) descreveram dez alterações moleculares envolvidas com o desenvolvimento do câncer, são elas: a manutenção dos sinais de proliferação; o escape da ação de supressores de tumor; resistência aos sinais indutores de morte celular; indução de imortalidade replicativa e de angiogênese; inflamação pró-tumoral; alterações no metabolismo energético; evasão do sistema imune; instabilidade genômica e mutações; ativação de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.3 EVENTOS MOLECULARES RELACIONADOS AS METÁSTASES

A progressão tumoral é o processo caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células que carregam uma ou mais das alterações citadas, promovendo a evolução da doença até suas manifestações clínicas (ARVELO *et al.*, 2016). Durante esta progressão, algumas células podem adquirir a capacidade de se disseminar para tecidos ou órgãos mais distantes, iniciando o que se chama de metástase (FIGURA 1). A metástase consiste no processo pelo qual células tumorais conseguem deixar o tumor primário, invadir o tecido adjacente,

alcançar vasos sanguíneos e linfáticos na etapa de intravasamento, sobreviver na circulação, deixar o vaso na etapa de extravasamento e colonizar um novo órgão, formando um foco de tumor secundário ou metastático (LAMBERT *et al.*, 2016). A disseminação metastática de células é responsável por 90% das mortes causadas pelo câncer, o que demonstra a urgência em compreender esse processo e identificar possíveis alvos ou moléculas terapêuticas (CHAFFER, C. L.; WEINBERG, 2011).

FIGURA 1 – DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA DAS CÉLULAS TUMORAIS



FONTE: Adaptado de REYMOND *et al.*, 2013

NOTA: Algumas células do tumor primário adquirem características migratórias e invasivas, podendo invadir o tecido adjacente e chegar aos vasos sanguíneos. Estas células adentram a corrente sanguínea através do intravasamento, quando atravessam as junções celulares de células endoteliais. Então, são transportadas pela circulação sanguínea até sítios distantes, onde fazem o extravasamento, saindo da circulação. Este processo envolve a interação entre receptores específicos da célula tumoral e do endotélio e/ou o aprisionamento de células dentro do vaso devido a limitações de tamanho, o que também leva a adesão destas ao endotélio e resulta na migração transendotelial (TEM). Estas células podem entrar em estado de dormência ou proliferar no novo microambiente, algumas delas dando origem a metástase. Entretanto, a maioria das células capazes de extravasar são eliminadas pela ativação da morte celular e não colonizam o novo tecido.

Estudos recentes demonstram a importância do microambiente tumoral como fator determinante para a metástase. A interação ocorre, principalmente, através da produção de citocinas e fatores de crescimento tanto pelas células tumorais, quanto pelas células presentes no estroma. Ainda, a interação da célula-MEC através de receptores de membranas também influencia nos eventos moleculares que levam a metástases, como a adesão, migração e invasão celular (WANG *et al.*, 2017).

2.3.1 Adesão celular mediada por integrinas

Nas últimas décadas, compreendeu-se que a interação entre as células tumorais e o microambiente tumoral tem um papel crítico na regulação das metástases. Fisiologicamente, a matriz extracelular (MEC) participa da manutenção da estrutura dos tecidos, além de desencadear sinais para a proliferação, sobrevivência, adesão, mobilidade e morte celular. No câncer, todavia, células presentes na MEC, tais como fibroblastos e células do sistema imune, produzem fatores de crescimento e citocinas que estimulam o desenvolvimento do tumor (BLANDIN *et al.*, 2015).

Um mecanismo já descrito durante a progressão tumoral é a regulação de proteínas de adesão na membrana, principalmente através de integrinas (KATO *et al.*, 2012). As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade α e uma β ligadas de maneira não covalente. A combinação entre diferentes unidades α e β gera proteínas com afinidades a ligantes diferentes, sendo possíveis 24 arranjos diferentes a partir de 18 subunidades α e 8 subunidades β já descritas (AKSORN; CHANVORACHOTE, 2019). A integrina $\beta 1$, encontrada na maioria dos tecidos tumorais, possui afinidade ao colágeno, laminina e fibronectina, de acordo com a subunidade α complementar (AKSORN, N; CHANVORACHOTE, 2019). Apesar do crescente interesse, o papel desta proteína no câncer ainda é controverso. Enquanto o aumento de integrina $\beta 1$ associada a diferentes α já foi correlacionada com aumento de metástases e menor taxa de sobrevida em tumores hepáticos ($\alpha 2\beta 1$), mamários ($\alpha 3\beta 1$), melanoma ($\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$) e pulmonares ($\alpha 5\beta 1$), a combinação $\alpha 2\beta 1$ parece desempenhar um papel de supressor de tumor em carcinoma de mama (KATO *et al.*, 2012; BLANDIN *et al.*, 2015).

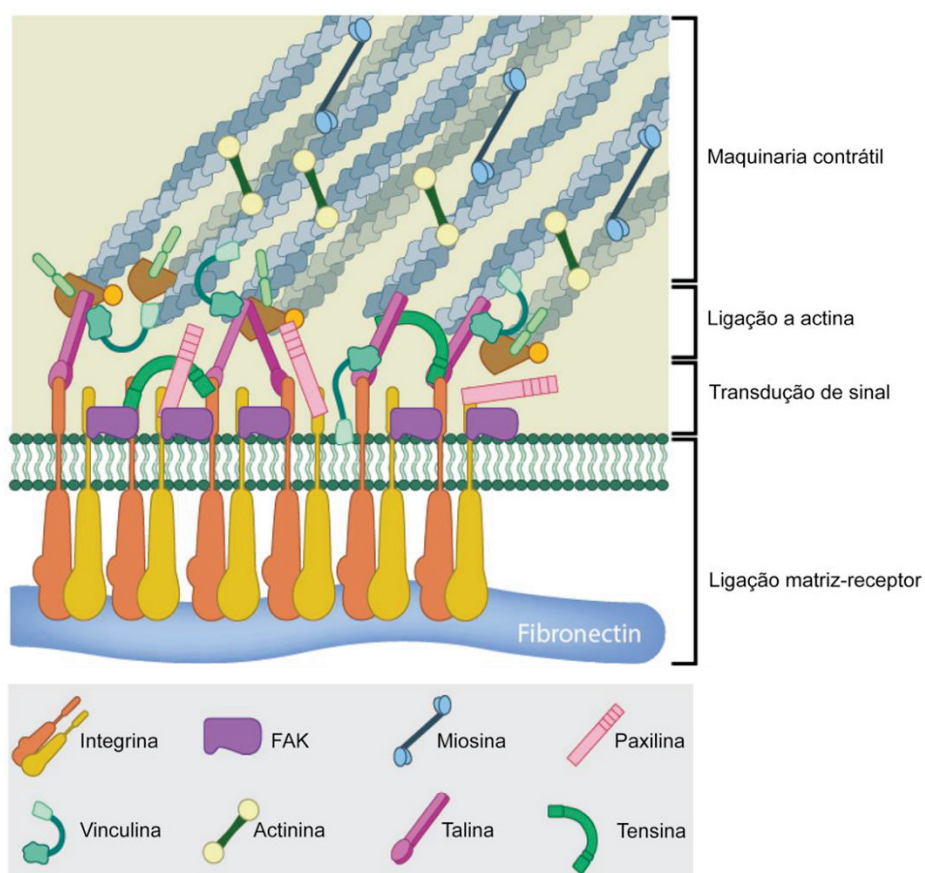
O papel relevante das integrinas deve-se a sua sinalização bidirecional, tanto de dentro para fora (*inside-out*), quanto de fora para dentro (*outside-in*). O exemplo clássico de sinalização *inside-out* é a própria ativação das integrinas. Elas são expressas na membrana plasmática em sua conformação inativa, incapazes de interagir com seus ligantes, até que um sinal intracelular as ative através da ligação de proteínas específicas (ex: talina) a suas caudas citoplasmáticas. Fisiologicamente, isto é importante porque permite que as células sejam transportadas na circulação sanguínea com a mínima interação com as paredes dos vasos e com as plaquetas (LEGATE *et al.*, 2009). No câncer, entretanto, este

processo é especialmente importante durante a metástase, no qual a célula precisa migrar e invadir o tecido adjacente, interagindo diretamente com a MEC (PAN *et al.*, 2018).

Já durante a sinalização *outside-in*, a interação integrina-ligante ativa sinais pró-sobrevivência na célula, por exemplo, pelo aumento do fator nuclear kB (NF-kB), estímulo da via PI3K-Akt, diminuição de p53 e pela regulação de moléculas apoptóticas (MORENO-LAYSECA; STREULI, 2014). Porém, o domínio intracelular das integrinas não apresenta atividade de transdução de sinal, sendo necessário outros elementos para compor a sinalização de fora para dentro e formando o complexo de adesão focal.

Estão presentes na adesão focal as proteínas que conectam as integrinas à actina (ex: talina e α -actinina); proteínas envolvidas na transdução de sinal (ex: paxilina e FAK); proteínas que reforçam as ligações com o citoesqueleto (ex: vinculina) e outras proteínas que fazem a manutenção do complexo (LEGATE *et al.*, 2009). Uma vez ligadas, as integrinas fazem a ancoragem do citoesqueleto de actina aos componentes da MEC, fornecendo suporte mecânico e funcionando como receptores de estímulos extracelulares (AKSORN; CHANVORACHOTE, 2019) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – PROTEÍNAS DO COMPLEXO DE ADESÃO FOCAL



FONTE: Adaptado de ZAIDEL-BAR *et al.*, 2007.

NOTA: A adesão focal é formada por um conjunto de proteínas que fazem a ligação entre componentes da MEC e os microfilamentos de actina da célula. A ligação às proteínas da matriz é feita pelas integrinas, receptores transmembranais. Intracelularmente, as proteínas talina e tensina fazem a ponte entre a actinina do citoesqueleto e as integrinas, enquanto a vinculina estabiliza essa ligação, tornando-a mais resistente. Os microfilamentos estão associados às proteínas que fazem as ligações cruzadas entre eles (actinina) e são responsáveis pela contração (miosina). A paxilina é a principal proteína adaptadora da transdução de sinal, a qual se ligam diversas proteínas tirosina-quinases (FAK e Src).

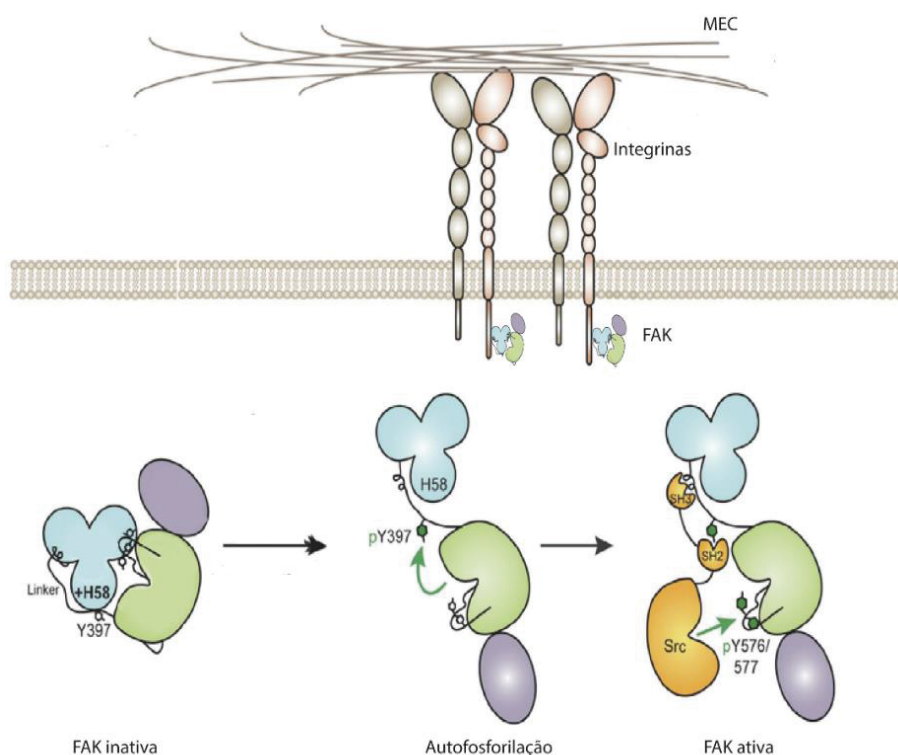
2.3.2 Sinalização mediada por FAK

A principal via intracelular ativada por integrinas acontece por meio da quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*), uma proteína com atividade tirosina-quinase associada aos receptores plasmáticos nos complexos de adesão focal (SULZMAIER *et al.*, 2014). O mecanismo de ativação de FAK melhor descrito ocorre quando, após a ligação aos componentes da MEC, as integrinas ativadas formam *clusters* (FIGURA 3). Então, a FAK associada às porções citoplasmáticas destes receptores, sofre autofosforilação em um resíduo de tirosina (Y397), anteriormente bloqueado pela extremidade N-terminal da proteína. Essa fosforilação

em tirosina resulta na formação de um sítio de alta afinidade para a porção SH2 da Src e essa associação favorece a fosforilação em outros resíduos de tirosina da FAK (407, 576, 577, 861 e 925), levando a uma atividade máxima desta proteína. Por sua vez, Src que também possui atividade tirosina-quinase, é ativada por fosforilação quando se liga a FAK (GUAN, 2010).

Desta forma, após etapas sucessivas de fosforilação que elevam sua atividade, FAK e Src estimulam vias de proliferação celular (PI3K/Akt), promovem a reorganização do citoesqueleto para aumentar a motilidade celular, estimulam a transição epitélio-mesênquima (TEM) e aumentam invasividade de células através da regulação positiva de metaloproteinases de matriz (MITRA; SCHLAEPFER, 2006; SULZMAIER *et al.*, 2014).

FIGURA 3 – ATIVAÇÃO DE FAK POR CLUSTER DE INTEGRINAS



FONTE: Adaptado de LAWSON & SCHLAEPFER, 2013

NOTA: A interação com componentes da MEC leva a formação de *clusters* das integrinas que se encontravam dispersas na membrana plasmática. Uma vez ativadas, a sinalização intracelular é mediada por FAK, que é ativado por um mecanismo de auto-fosforilação do resíduo de tirosina 397 (Y397) localizado no domínio N-terminal (azul). Isto provoca uma mudança conformacional na proteína, expondo o domínio com atividade quinase (verde) e sítios de ligação a outras proteínas. A Y397 fosforilada recruta outra tirosina-quinase conhecida como Src, que, uma vez ativada, fosforila os resíduos Y576-577 da FAK, incrementando sua atividade.

No câncer, o aumento da expressão ou da fosforilação de FAK já foi relatado para diversos tipos de tumores, incluindo o câncer de mama triplo-negativo. Nestas células, a superexpressão de FAK leva à TEM, tornando-as mais migratórias, mais invasivas e aumentando a ocorrência de metástases, além de estar relacionada ao estímulo para angiogênese e à resistência a quimioterapia (PAN *et al.*, 2019). Neste contexto, o uso de inibidores de FAK como estratégias para o tratamento de câncer vem ganhando destaque. A principal forma de inibição consiste em utilizar moléculas pequenas que competem com o ATP e impedem a ativação por fosforilação de Y397. Estudos utilizando linhagens celulares de mama demonstraram que esta inibição leva a diminuição da migração celular, entretanto, não desencadeia a morte das células. Já para modelos de tumor de ovário *in vivo*, observou-se a redução do tamanho do tumor e uma baixa toxicidade sistêmica do tratamento (TANJONI *et al.*, 2010). Estudos clínicos recentes demonstraram a eficácia da inibição de FAK como estratégia terapêutica, principalmente quando associada a quimioterapias clássicas. Portanto, este tratamento se demonstra interessante em cenários de resistência a quimioterápicos e de tumores com possibilidades de tratamento reduzidas, especialmente para os tumores de mama do tipo triplo-negativo (SULZMAIER *et al.*, 2014; RIGIRACCILO *et al.*, 2019).

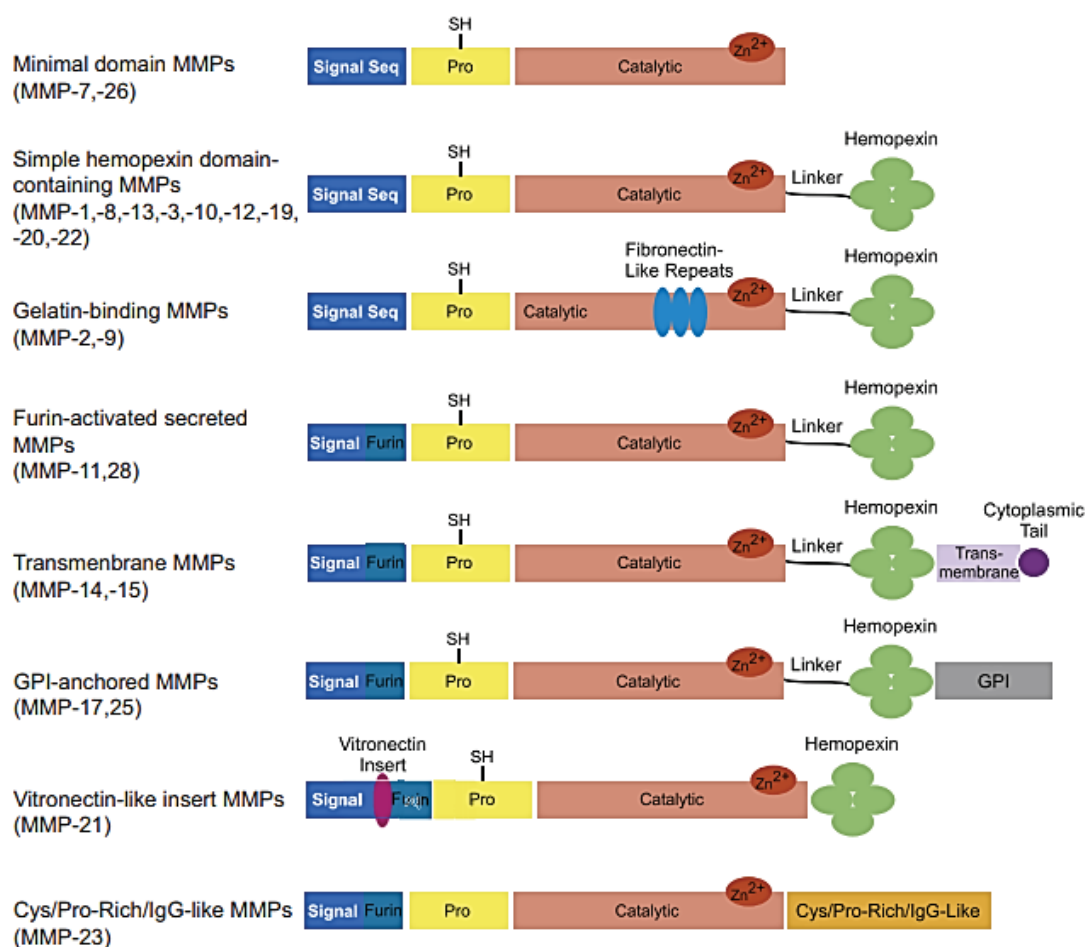
2.3.3 Mecanismo de Invasão Tumoral

Durante a disseminação metastática, as células tumorais precisam invadir o tecido local para alcançar a circulação, degradando os componentes da matriz extracelular que funcionam como uma barreira física. Este evento é mediado por diversos tipos de proteases, dentre as quais se destacam as metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs compõem um grupo de endopeptidases zinco-dependentes capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular tais como o colágeno, a fibronectina, a laminina, a vitronectina e os proteoglicanos (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Elas formam uma família de proteínas semelhantes estruturalmente, porém, com especificidades a substratos variados. Na região N-terminal da proteína, encontra-se um pré-domínio, sequência de sinalização que direciona a síntese para o retículo endoplasmático. Este é seguido por um domínio pró-peptídeo, cuja função é manter a enzima em seu estado inativo até que seja removido por clivagem, e pelo domínio catalítico, que possui

sequências conservadas de ligação a zinco. O domínio C-terminal, presente na maioria das MMPs, determina a especificidade da enzima pelo substrato (JABŁOŃSKA-TRYPUĆ *et al.*, 2016).

Essas proteases podem ser divididas em dois grupos: as MMPs solúveis, que são secretadas pelas células, e as MMPs de membrana, que são aderidas à superfície celular e também conhecidas como MT-MMPs (FIGURA 4). Podem ser classificadas ainda de acordo com seu substrato, sendo: as collagenases (MMP-1, -8 e -13), as estromelisinases (MMP-3, -10 e -11), as MMPs de membrana (MMP-14, -17, -24 e -25), as matrilisinas (MMP-7 e -26) e, por último, as gelatinases (MMP-2 e -9). Em geral, as MMPs são secretadas pelas células na sua forma inativa (zimogênio) e necessitam de ativação por clivagem proteolítica (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ.



FONTE: Adaptado de CATHCART *et al.*, 2015.

NOTA: As MMPs possuem uma estrutura básica composta por: domínio N-terminal, que faz o direcionamento da proteína; um pró-domínio (Pro), cuja clivagem é necessária para a ativação; o sítio

catalítico dependente de zinco; e o domínio homólogo à hemopexina, relacionando à especificidade ao substrato e a interações com outras proteínas (ausente apenas nas MMP-7 e -26). As modificações nesta estrutura incluem a presença de motivos semelhantes a fibronectina, que conferem a ligação à gelatina e ao colágeno do tipo IV (MMP-2 e -9); um domínio rico em cisteína/prolina semelhante a imunoglobulina (MMP-23); sequência semelhante a vitronectina (MMP-21); e domínios adicionais para ancoragem a membrana, presentes nas MT-MMPS (MMP-14, -15, -17 e -25).

A maioria das MMPs não é expressa constitutivamente em grandes quantidades pelas células, sendo observada apenas uma expressão basal destas proteínas. No entanto, tem sua expressão induzida por sinalização exógena, por exemplo, por fatores de crescimento, citocinas, pela transformação oncogênica ou por alterações de contato célula-matriz e célula-célula (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ *et al.*, 2018).

Em situações fisiológicas, estas proteínas participam de processos de cicatrização, da involução mamária e da implantação do embrião. Neste contexto, a liberação e a ativação destas proteínas são controladas por seus inibidores enzimáticos. Porém, no contexto do câncer essa regulação é dificultada pela perda da homeostasia do tecido, limitando a atuação dos inibidores, permitindo que elas abram caminho através da MEC e facilitando a disseminação metastática (KÖHRMANN *et al.*, 2009).

Além da participação nos processos de invasão e metástase, as MMPs estão envolvidas na modulação de outros processos do microambiente tumoral, como nos sinais de crescimento celular, apoptose, processos angiogênicos e inflamatórios, além da preparação do nicho metastático, local onde as células metastáticas irão se estabelecer. Isso se deve à capacidade de clivar receptores de membrana, modificando a adesão celular, de sinalizar por meio de citocinas e de ativar fatores de crescimento (KESSENBROCK *et al.*, 2010).

Dentre as MMPs, as mais relacionadas com o câncer de mama são a MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B), que diferem estruturalmente das demais por conterem um domínio semelhante à fibronectina na região entre o sítio catalítico e o domínio hemopexina (CATHCART *et al.*, 2015). A expressão elevada destas proteínas está correlacionada aos piores prognósticos, maiores chances de metástases e menores tempo de sobrevida, pois elas tem como substrato principal o colágeno IV, componente majoritário da membrana basal que separa as células epiteliais do estroma (DUFFY *et al.*, 2000). Sua atividade nos tecidos é regulada naturalmente por um inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2) e pela MMP-

14 (também chamada de MT1-MMP). A co-expressão de MMP-2 e MMP-14 já foram relacionadas aos piores prognósticos em carcinomas mamários invasivos, indicando estas moléculas como biomarcadores para a agressividade e invasividade de tumores (AL-RAAWI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2017).

2.3.4 Processo de Angiogênese Tumoral

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Este processo é regulado por um balanço entre moléculas pró e anti-angiogênicas, dentre elas o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (YANCOPOULOS *et al.*, 2000).

Em indivíduos adultos, a atividade angiogênica é limitada e as células endoteliais apresentam uma taxa de proliferação baixa quando comparada ao desenvolvimento embrionário e os primeiros anos de vida. No câncer, os tumores levam à formação constante de vasos e ao remodelamento endotelial. A sinalização para isto pode ser em decorrência das alterações metabólicas (ex: hipóxia), mutações genéticas, estresse mecânico (ex: pressão gerada pelo aumento da massa tumoral) e da resposta inflamatória gerada pelo tumor (EALES; HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016).

Diversos fatores pró-angiogênicos já foram identificados como marcadores para o câncer de mama, sendo o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) o mais importante deles. Este fator de transcrição está superexpresso em carcinomas ductais de mama e induz a expressão de VEGF e de seus receptores (KIM *et al.*, 2017). Além de promover a formação de vasos, a sinalização por VEGF também ativa o remodelamento da matriz extracelular e aumenta a permeabilidade vascular, comumente relacionado ao extravasamento que leva ao acúmulo de líquido na cavidade peritoneal de mulheres com câncer de mama metastático (OLSON *et al.*, 1994). Portanto, a expressão aumentada de HIF-1 e VEGF e a densidade microvascular tumoral já são considerados marcadores confiáveis de piores prognósticos e de metástase para o câncer (ZIEMER *et al.*, 2001).

2.4 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais bioativos derivados de microorganismos, organismos marinhos e, sobretudo, de plantas, representam uma fonte relevante de agentes terapêuticos e vem sendo utilizados desde os primórdios da humanidade. Um dos primeiros registros da utilização de plantas no tratamento de doenças data de 2.600 a.C. na Mesopotâmia, onde diversas espécies de cedro (*Cedrus sp.*), mirra (*Commiphora sp.*) e papoula (*Papaver somniferum*) eram utilizadas no tratamento de gripe, inflamações e doenças parasitárias (SAFE & KASIAPPAN, 2016).

Desde a introdução da quimioterapia na década de 30, aproximadamente 206 compostos foram aprovados para a utilização no tratamento do câncer, dos quais 75% são derivados de fontes naturais (GOTTESMAN *et al.*, 2016). Os primeiros compostos naturais a avançarem clinicamente como antitumorais foram o paclitaxel e os alcaloides vincristina e vimblastina. O paclitaxel (Taxol®) é uma molécula isolada da casca de *Taxus brevifolia*, cuja aprovação pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) ocorreu em 1992 para o tratamento de câncer de ovário e em 1994 para os tumores de mama. A vincristina e a vimblastina, por sua vez, são alcaloides obtidos da vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), planta proveniente de Madagascar que ganharam destaque na década de 60 sendo utilizados para o tratamento de linfoma de Hodgkin, câncer de ovário e testículos, e leucemia linfoblástica aguda infantil (SAFARZADEH; SHOTORBANI & BARADARAN, 2014). O exemplo bem-sucedido do paclitaxel e de seus análogos, que geraram mais de US\$ 1 bilhão de lucro anualmente ao longo da década de 90, elevou o interesse na descoberta de novos fármacos e na modificação química de moléculas de fontes naturais que apresentam potencial antitumoral, buscando a aplicação clínica destes compostos (HOWAT *et al.*, 2014).

Além de um efeito antitumoral direto, os produtos naturais podem atuar como radiomoduladores, protegendo as células normais adjacentes ao tumor dos efeitos da radioterapia (radioproteção) ou sensibilizando as células tumorais para torná-las mais suscetíveis a rádio ou quimioterapia (quimiosensibilização). Portanto, a utilização destes compostos pode aumentar a eficácia e diminuir os efeitos adversos associados aos tratamentos, pois a dose de radiação ou quimioterapia pode ser menor quando associada com o produto natural, obtendo-se efeitos semelhantes ou melhores (NAMBIAR; RAJAMANI & SINGH, 2011; AUNG *et al.*, 2017).

2.4.1 Compostos Terpenos

Os terpenos, também chamados de isoprenóides ou terpenóides, são compostos de origem natural que vem ganhando destaque devido às suas diversas atividades biológicas. A classe dos terpenos abrange moléculas derivadas da reação de condensação do pirofosfato de dimetilalilo e do pirofosfato de isopentenilo, ambos isômeros com fórmula $C_5H_{12}O_7P_2$, e produzidos na via de biossíntese de mevalonato. Estes compostos são classificados de acordo com sua estrutura química e número de carbonos, podendo ser: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) ou politerpenos (> C40) (TETALI, 2019).

Os terpenos estão presentes em organismo uni ou pluricelulares, incluindo bactérias, arqueobactérias, protozoários e eucariotos, entretanto, a maior parte das moléculas já identificadas advém de plantas (SALEHI *et al.*, 2018; TETALI, 2019). Em plantas vasculares, são sintetizados por enzimas terpenóide sintases (TPS) e podem ser metabólitos primários, quando participam de atividades celulares essenciais, por exemplo na forma de pigmentos fotossintéticos e fitormônios, ou metabólitos secundários, tendo função de defesa, odorização, entre outras (GAO; HONZATKO & PETERS, 2012).

Dentre as mais de 30.000 moléculas já identificadas, os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) destacam-se quanto as suas propriedades antitumorais e potenciais aplicações na terapia do câncer. O álcool perílico, composto presente na lavanda (*Lavandula angustifolia*), apresenta atividade quimiopreventiva para câncer de cólon, pulmão e pâncreas (CHEN; DA FONSECA; SCHÖNTHAL, 2015). Ensaio *in vivo* utilizando modelos de tumor de colón em ratos demonstraram que animais que receberam 1 g/kg de álcool perílico via oral desenvolveram tumores com menores volume devido ao aumento da apoptose (REDDY *et al.*, 1997). Efeitos pró-apoptóticos e antimetastáticos desta molécula foram observados também em glioblastoma, mieloma e cólon *in vitro* (KOYAMA *et al.*, 2013; SAFARZADEH; SHOTORBANI & BARADARAN, 2014; CHEN *et al.*, 2018).

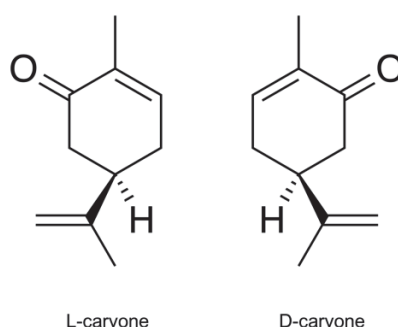
Outro monoterpeno entre os mais estudados é o geraniol, que foi capaz de modular diversas funções celulares associadas à progressão tumoral, como a proliferação celular, a angiogênese e a apoptose (CHO *et al.*, 2016). O geraniol induziu a apoptose em células tumorais de mama (MCF7), próstata (PC-3) e pulmão

(A549), além de provocar a parada do ciclo celular, inibindo a proliferação destas células (DUNCAN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2011; GALLE *et al.*, 2014). Ainda, tratamentos com geraniol provocaram a quimiosensibilização de células tumorais de cólon (Caco2) a tratamentos com 5-Fluorouracil (CARNESECCHI *et al.*, 2002). Em conjunto, estes resultados demonstram a relevância dos estudos acerca do potencial antitumoral dos monoterpenos para a utilização como adjuvantes no tratamento do câncer.

2.4.2 O monoterpeno L-carvone (ou R-(-)-carvone)

O carvone (*p*-menta-6,8-dien-2-ona) é um monoterpeno cetônico encontrados na composição de óleos essenciais de diversas plantas. Em razão da presença de um carbono quiral, o carvone pode ser encontrado na natureza sob duas formas enantioméricas: o D-carvone (ou S-(+)-carvone) e o L-carvone (ou R-(-)-carvone) (FIGURA 5).

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CARVONE



FONTE: Adaptado de CARVALHO & FONSECA, 2006

O enantiômero D-carvone é o principal constituinte (50-70%) de óleos essenciais de cominho (*Carum carvi*), sendo responsável pelo odor característico da planta. Já a forma L-carvone é encontrada principalmente em plantas do gênero *Mentha*, com destaque para as espécies *Mentha spicata* (L.) e *Mentha longifolia* (L.) Huds, conhecidas popularmente como hortelã (KOKKINI; KAROUSOU & LANARAS, 1995; YOUNIS & BESHIR, 2004).

Ambos os enantiômeros possuem diversas atividades biológicas descritas. Aggarwal *et al.* (2002) demonstraram o potencial antimicrobiano destes compostos contra um amplo espectro de patógenos, entre eles *Salmonella typhi*,

Staphylococcus aureus e *Aspergillus niger*. Entretanto, existem diferenças do potencial entre as formas enantioméricas, uma vez que o L-carvone mostrou-se mais eficaz contra *Campylobacter jejuni*, enquanto o D-carvone teve maior efeito sobre *Listeria monocytogene*. Por sua vez, ambos apresentaram efeito inibitório contra o fungo *Candida albicans*, cujas estratégias terapêuticas ainda são limitadas (MCGEADY; WANSLEY & LOGAN, 2002).

Óleos essenciais de espécies de hortelã e o carvone isolado também se destacam quanto a atividade inseticida e repelente. Yildirim e colaboradores (2013) demonstraram que o carvone possui efeito inseticida e inibe o desenvolvimento de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, um besouro da família Curculionidae considerado praga do milho. Já para outras espécies de insetos, foi demonstrado um efeito repelente, como para besouros *Hylobius abietis* e mosquitos *Aedes aegypti*, um dos principais insetos de importância médica do Brasil (HO, 2004).

A grande maioria dos estudos acerca dos efeitos biológicos do carvone e seus análogos tem como enfoque seu potencial anticonvulsivante e antinociceptivo. Através de modelos de dor em camundongos, foi possível observar uma redução da excitabilidade de neurônios periférico dos animais tratados com 100 mg/kg de L-carvone, o que indica uma possível utilização deste composto na diminuição da dor (GONÇALVES *et al.*, 2008). Também relacionado aos distúrbios neuronais, este composto apresentou efeitos depressores sobre o sistema nervoso central, com uma possível ação sedativa e antimaníaca (NOGOCEKE *et al.*, 2016).

Quanto aos estudos na área do câncer, Zheng *et al.* (1992) demonstraram que o carvone provocou um aumento na atividade da enzima glutatona-S-transferase, um importante mecanismo antioxidante em diversos tecidos animais. Quando comparada ao L-carvone, o efeito do D-carvone foi menor, o que indica uma menor eficiência desta molécula para a quimioprevenção. Efeitos quimiopreventivos também foram descritos em outros estudos utilizando estes enantiômeros (MORO *et al.*, 2006). Patel e Thakkar (2014) demonstraram que o L-carvone possui efeito citotóxico contra linhagens tumorais de mama, além de inibir a migração celular e induzir a morte celular pela ativação da sinalização pró-apoptótica. Este mesmo efeito foi observado em linhagem de mieloma humano (KMS-5), onde foi relatado ainda a parada do ciclo celular na fase de G2/M e a inibição da via de proliferação p38/MAPK (DING; CHEN, 2018).

A atividade antitumoral *in vivo* já foi descrita para o enantiômero D-carvone, que inibiu em 60% a formação de adenoma pulmonar induzido por N-nitrosodietilamina (NDEA) quando administrado antes do carcinógeno (WATTENBERG; SPARNINS; BARANY, 1989). O tratamento com 20 mg/kg deste composto também inibiu o crescimento tumoral e ativou a apoptose em modelos de tumor de pele induzidos (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2019). Para a forma L, entretanto, estudos *in vivo* são escassos. O único relato na literatura mostrou que não foram observadas diferenças entre animais controle e tratados com 100 µM/kg para modelos de metástases pulmonar induzidas por linhagens de melanoma (B16F-10) (RAPHAEL; KUTTAN, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* do L-carvone frente aos modelos tumorais de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo do L-carvone nas linhagens tumorais de mama MCF7 e MDAMB-231;
- ✓ Avaliar alterações morfológicas e estruturais nas células expostas ao L-carvone por microscopia eletrônica de varredura e marcação do citoesqueleto;
- ✓ Analisar a influência do L-carvone sobre diferentes processos celulares *in vitro* (proliferação, adesão, migração, invasão);
- ✓ Determinar o efeito do L-carvone no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*;
- ✓ Identificar alterações na expressão de genes e proteínas relacionadas à progressão tumoral e metástase;
- ✓ Determinar o efeito do L-carvone sobre moléculas pró-angiogênicas *in vitro* e *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 Linhagens Tumoriais

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram adquiridas da ATCC. As linhagens tumorais de mama MDAMB-231 e MCF7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina e 40 µg/ml de garamicina. As garrafas foram mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, conforme protocolo sugerido pela ATCC.

4.1.2 Ensaio de Viabilidade pelo método de MTT

O efeito do L-carvone (Sigma-Aldrich) sobre a viabilidade celular foi avaliado utilizando o reagente brometo de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich). Este ensaio é baseado na clivagem dos anéis tetrazolium do MTT pelas desidrogenases mitocondriais, resultando na formação do formazan um cristal de coloração violeta, como distrito por Mosmann (1983). Para este ensaio, 5 x 10³ células foram adicionadas a cada poço em placas de 96 poços. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado e diferentes concentrações de L-carvone (0 – 1 µM) solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionadas seguido por incubação de 24, 48 e 72 horas. Após o período de tratamento, o meio contendo os compostos foi retirado e uma solução de MTT 0,5 mg/ml foi adicionada a cada poço (100 µl/poço). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 4 horas e em seguida os cristais de formazan foram solubilizados utilizando DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular para cada concentração testada foi calculada de acordo com a fórmula: Viabilidade (%) = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$, na qual Abs_{amostra} indica o valor de absorbância obtido na concentração-teste e Abs_{controle} indica a absorbância obtida nos poços que não receberam tratamento. A determinação do IC₅₀ (concentração na qual a viabilidade celular corresponde a 50%) dos compostos foi determinada a partir da curva dose-

resposta utilizando regressão não-linear no *software GraphPad Prism®* (versão 8.0.1).

4.1.3 Curva de Proliferação

O ensaio de proliferação celular através do método de cristal violeta permite obter dados quantitativos relativos à densidade celular presente em monocamadas de células cultivadas. O corante liga-se ao núcleo das células, e após a eluição e leitura de absorbância, é possível estabelecer uma relação direta entre a absorbância e o número de células presentes nos poços. Para este ensaio, 3×10^3 células foram transferidas para placas de 96 poços. Após 24h, estas foram tratadas com L-carvone na concentração de 100 nM por até 72h. Após o período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos, lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM) 1x, coradas com 100 μL da solução de cristal violeta 0,2% (Sigma) em etanol (Merck) 5%, durante 5 minutos, e então lavadas novamente com PBS para a remoção do corante residual. O corante foi então eluído com 100 μL da solução de ácido acético 33% em água ultrapura. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, procedendo-se então para a leitura da absorbância em leitora de microplacas em 570 nm (Biotek).

4.1.4 Análise do Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada utilizando o FITC-BrdU Flow kit (BD Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante. As células ($2,5 \times 10^4$ por poço) foram incubadas com o BrdU por 6 horas, posteriormente tripsinizadas, lavadas com PBS 1x, fixadas com Permafix® por 30 minutos no gelo e o DNA total foi marcado com 7-aminoactinomycin D (7-AAD). As amostras foram analisadas em citômetro (FACSCalibur).

A bromodeoxiuridina (BrdU) é uma molécula análoga à timidina, portanto, é incorporado às fitas de DNA recém-sintetizadas durante a fase S do ciclo celular. Já o 7-AAD é um composto intercalante de DNA, sendo utilizado para a marcação do DNA total da célula. A marcação combinada de BrdU/7-AAD é comumente utilizada para estudar o efeito de compostos que alteram o ciclo celular das células, pois

permite quantificar a atividade de síntese de DNA em relação à distribuição das fases do ciclo.

4.1.5 Ensaio de Migração Celular

O ensaio de migração celular foi realizado através do método de *wound healing* ou *scratch*. Cerca de $2,5 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas em placas de 12 poços e deixadas aderir por cerca de 16h. No dia seguinte, as células foram tratadas com L-carvone na concentração de 100 nM por 72 horas. Após o período de tratamento, o meio contendo o composto foi substituído por meio sem soro, sendo o SFB depletado por um período de 4 horas. Em seguida, foi feito um risco com o auxílio de uma ponteira de 200 μ l e os poços foram cuidadosamente lavados com PBS para a remoção de fragmentos celulares não aderidos. Imagens foram capturadas nos tempos de 24 e 48 horas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000) em dois campos diferentes por poço. A área de fechamento do risco pela migração celular foi medida através do software ImageJ e a porcentagem de fechamento foi calculada utilizando a seguinte equação, onde, $A_{t=0h}$ é a medida da área do risco imediatamente após sua realização e $A_{t=\Delta h}$ é a medida da área do risco após 24 ou 48 horas de incubação com os compostos.

$$\% \text{ fechamento} = \frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \times 100$$

4.1.6 Ensaio de Adesão Celular

O ensaio de adesão celular foi realizado em placas de 96 poços tratadas com 15 μ g/ml de fibronectina, colágeno I e laminina diluídos em PBS 1x e incubadas a 4°C por 16h, e, posteriormente bloqueadas com BSA 1% a 37 °C por 1 h. Para isso, 5×10^4 células previamente tratadas com L-carvone e plaqueadas sobre as diferentes proteínas da MEC e deixadas aderir por duas horas. Em seguida, os poços foram lavados para retirar células não aderidas, e as células restantes foram fixadas com PFA 4% e coradas com cristal violeta 0,5% em metanol 20%. Após sucessivas lavagens com água destilada, o corante foi extraído utilizando solução de etanol 50%

em citrato de sódio 1M pH 4,5 e a absorbância em 550 nm foi medida em leitor de microplacas (Bio-Tek).

4.1.7 Ensaio de Invasão Celular

As células MDAMB-231 foram pré-tratadas com 100 e 250 nM de L-carvone por 48 horas em placa de 6 poços, soltas com EDTA 2 mM e ressuspensas em meio RPMI sem SFB. Em seguida, 1×10^5 células foram plaqueadas em insertos de *transwell* contendo membranas de polycarbonato com poros de 8 μ m (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) revestidos com matrigel em placas de 24 poços. Na câmara inferior, foi adicionado meio RPMI contendo 10% de SFB com o objetivo de quimioatração das células. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em incubadora a 5% de CO₂. Após esse período, as membranas foram fixadas em PFA 2% por 20 minutos e as células foram coradas com 1 μ g/ml de DAPI (Thermo Fischer, Massachussets, Estados Unidos) em PBS 1x contendo 0,01% de saponina e faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, Massachussets, Estados Unidos) a temperatura ambiente. As células que não invadiram foram removidas utilizando hastes flexíveis com algodão e as membranas foram montadas sobre lâminas histológicas utilizando Fluormount G (*Thermo Fischer Scientific Inc.*). As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Axio Imager Z2 com o auxílio do *software* Metafer e a quantificação foi realizada através da contagem de núcleos utilizando o *software* ImageJ.

4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de observar modificações morfológicas e ultraestruturais nas células expostas ao tratamento com L-Carvone, foi realizado o processamento das amostras para avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para este experimento, 3×10^4 células/poço de MDAMB-231 e MCF7 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares com 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços. As células

foram mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas e, em seguida, tratadas ou não (grupo controle) com 100 nM de L-carvone durante 48h.

Após os tratamentos, as células foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, CaCl₂ 1 mM em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4) por 1 hora. Após esse período, as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 M, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (Merck) a 30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%, por um período de 10 minutos em cada concentração. Então, as células foram submetidas ao ponto crítico do CO₂ (Modelo CPD 010 Critical Point Dryer, Balzers) e metalizadas com ouro (Modelo SCD 030 *Balzers Union* FL 9496, Balzers). As imagens foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL J.S.M-6360 L.V., EUA) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

4.2.2 Imunodeteção de Proteínas

Para a análise das proteínas, as linhagens MDAMB-231 e MCF7 foram cultivadas em placas de 100 mm² até atingir a confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, estas foram lavadas com PBS 1x gelado e adicionado tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl, pH; 0,5% Deoxicolato; 150 mM NaCl, 0,1% SDS), contendo inibidor de protease (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail – Thermo Fisher*) e EDTA 1 mM. Posteriormente, as células foram raspadas da placa e o lisado transferido para um microtubo, centrifugado a 10.000 X g por 10 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante. A quantificação proteica foi realizada por meio do método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) para a obtenção da curva padrão (BRADFORD, 1976).

Para a reação de imunodeteção, 25 µg das amostras quantificadas foram adicionadas a tampão de amostra redutor (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e aquecidas a 100°C durante 10 minutos antes da aplicação no gel de poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF (*Hybond ECL- GE Healthcare*), pré-ativada com metanol, em tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) a 350 mA por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris pH 7,6; 2,42 g/L; NaCl 8 g/L; tween 20

1mL/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Então, a membrana foi lavada com TBS (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L) duas vezes e TBST uma vez, e em seguida incubada com a solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários anti-integrina $\beta 1$ (Abcam 12G10; 1:1000), anti-MMP-2 (Thermo Fischer Scientific Inc. 2C1-1D12; 1:500), anti-FAK (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-557; 1:1000), anti-Y397 pFAK (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-11765-R; 1:500), anti-HIF1 α (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-10790; 1:250) e anti- β -actina (Sigma-Aldrich AC-74; 1:5000). O anticorpo primário foi retirado por meio de três lavagens sucessivas com TBST, por 10 minutos cada. Então, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-mouse IgG HRP (Abcam ab97023; 1:5000). Depois de cinco lavagens com TBS e TBST, a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com o reagente *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore) utilizando filme de Raio X, e com tampões revelador e fixador. A intensidade das bandas foi analisada utilizando o *software ImageJ* e os valores foram normalizados pela intensidade das bandas obtidas nos controles pela quantidade de proteína aplicada.

4.2.3 Análise da Atividade Gelatinolítica por Zimografia

A avaliação da secreção e da atividade gelatinolítica da proteína MMP-2 foi realizada por zimografia. Neste ensaio, foi utilizado o meio de cultura condicionado de MDAMB-231 expostas ou não ao L-carvone. Aproximadamente 6 ml do sobrenadante de cada uma das condições testadas foi concentrado a vácuo por aproximadamente duas horas (*Savant SPD SpeedVac*) para um volume de aproximadamente 100 μ L, o qual foi precipitado utilizando metanol e clorofórmio. As proteínas foram ressuspensas em tampão RIPA, quantificadas pelo método de Bradford e adicionadas ao tampão de amostra sem agente redutor, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60 mM Tris pH 6,8, 30 % de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em solução de 10 mM de Tris (pH 8,0) contendo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado em solução contendo 5 mM de CaCl_2 , 150

mM de NaCl e 1 mM de ZnSO₄ a 37 °C por aproximadamente 48 horas. Após esse período, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e descorado com solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. As bandas resultantes da degradação da gelatina foram analisadas por densitometria utilizando o *software ImageJ*.

4.2.4 Imunofluorescência

Para a imunomarcação, $2,5 \times 10^4$ das células foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com L-carvone a 100 nM por 48 horas. Após os tratamentos, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x e fixadas com PFA 2% por 20 minutos. A seguir, foi realizado o bloqueio dos radicais aldeídicos livres pela incubação com solução de glicina 0,1 M por 2 minutos (Merck). Após a lavagem novamente com PBS, as células foram incubadas com solução de BSA 1% e saponina 0,1% em PBS por 1h, para o bloqueio de sítios de interação inespecífica para proteínas e permeabilização das células.

Após a permeabilização, as células foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS contendo BSA 1% e saponina 0,1% por 16h. O anticorpo primário foi retirado e as células foram lavadas com PBS contendo saponina 0,01%, seguido por um novo bloqueio com PBS contendo BSA 1% e saponina 0,1% por 40 minutos. A seguir, as células foram incubadas com o anticorpo secundário por 40 minutos. Foram utilizados os anticorpos: primário anti-integrina $\beta 1$ (abcam, 1:500) e secundário anti-IgG de cabra conjugado com Texas Red (Thermo, 1:300) por 40 minutos. Ao final das reações de imunomarcação, as células foram novamente lavadas com PBS e então coradas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) a 3 μ M em PBS por 15 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 vezes, lavadas com água ultrapura e então montadas em lâminas histológicas com Fluoromont G (Electron Microscopy Science). O material foi analisado em microscopia confocal a laser (Nikon A1RSiMP+) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da Universidade Federal do Paraná.

4.2.5 Marcação do Citoesqueleto

Para analisar os efeitos dos compostos sobre a organização do citoesqueleto das linhagens tumorais de mama MDAMB-231 e MCF7, foi utilizado o marcador Alexa 488 Fluor® *Phalloidin* (Thermo Fisher Scientific) específico para fibras de F-actina. As células foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (5×10^4 células/lamínula) e incubadas a 37 °C por 24 horas para adesão. Em seguida, foram submetidas ao tratamento com L-carvone 100 nM por 48 horas. Após o tratamento, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 2% por 20 minutos. Para a marcação, as células fixadas foram submetidas a uma etapa de permeabilização em PBS contendo saponina 0,1% por 1 hora. Cada lamínula foi incubada com o marcador Alexa 488 Fluor® *Phalloidin* por 20 minutos, lavadas novamente com PBS e, em seguida, montadas sobre lâmina contendo Fluoromont G (Electron Microscopy Science) e DAPI (Molecular Probes). A relação núcleo:citoplasma foi calculada a partir das imagens obtidas utilizando a ferramenta “*Intensity ratio nuclei cytoplasmic tool*” do software ImageJ.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a análise da expressão gênica nas linhagens MDAMB-231 e MCF7, 5×10^4 células/poço foram transferidas para placas de 6 poços e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ até uma confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, foram tratadas com L-carvone na concentração de 100 nM por 48h. Após este período, as células foram lisadas com 1 ml de Trizol® (Invitrogen), incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e transferidas para microtubos. Em seguida, foram adicionados 250 µl de clorofórmio (Merck), homogeneizados por inversão e incubados no gelo por 3 minutos, seguindo-se de centrifugação a 12.000 x g a 4 °C por 20 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA e incubados a – 20 °C por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4 °C por 20 minutos, o isopropanol foi descartado e o RNA foi então lavado com 1 ml de etanol 75% em água ultrapura tratada com dietilpirocabonato e em seguida centrifugado por 10 minutos a 7.500 x g a 4°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o RNA seco e posteriormente dissolvido em 20 µl de água ultrapura livre de RNase. A qualidade e a pureza do material foram estimadas em

espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermo Scientific) e em gel de agarose 1% corado com SYBR™ Safe 1:10000 (*Thermo Fischer Scientific Inc.*). O RNA isolado (1 µg) foi reversamente transcrito utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*) de acordo com as recomendações do fabricante. Os cDNAs foram armazenados a – 20 °C até o momento do uso.

4.4 PCR EM TEMPO REAL

Para a PCR em tempo real foram utilizados o SYBR® Green 1x (*Applied Biosystems*), os oligos em concentrações de 400 nM, 600 nM e 900 nM; e o cDNA alvo em diluições testes de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 em sistemas de 10 µL no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). Para as linhagens humanas foram utilizados os normalizadores de expressão constitutiva *GAPDH* e *HPRT*. Os oligos utilizados para os genes alvos dosados foram avaliados quanto à eficiência de amplificação e encontram-se representados no Anexo I. Para os tumores de camundongos coletados, foi realizado o isolamento do RNA como descrito no item 4.3 e 2 µg deste RNA foram utilizados para a síntese do cDNA com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Para as reações, os cDNAs foram diluídos 1:5 e a concentração dos oligos utilizados foi de 800 nM em um volume final de 25 µl. Para a curva de calibração, foram utilizados os genes constitutivos murinos *Gapdh* (Gliceráldeído-3-fosfato desidrogenase) e *Rplp0* (*ribosomal protein large P0*). Os oligos utilizados estão representados no Anexo II. O cálculo da expressão foi realizado segundo Livak & Schmittgen (2001) utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.5 ENSAIOS IN VIVO

4.5.1 Modelo Tumoral de Erlich

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA-UFPR) sob o número 1225, processo 23075.048468/2018-44. Para a avaliação dos efeitos antitumorais de L-carvone *in vivo*, utilizou-se o tumor de Ehrlich sólido, um modelo de carcinoma murino de origem

mamária. Para a obtenção dos tumores, 2×10^6 células foram inoculadas em camundongos e cultivadas na forma de Carcinoma Ascítico de Ehrlich. Semanalmente, as células ascíticas foram avaliadas pelo método do azul de Trypan e transferidas para novos animais. Após quatro passagens, o tumor de Ehrlich sólido foi induzido em camundongos Swiss fêmeas (25 a 30 g) através da inoculação subcutânea de $2,5 \times 10^6$ destas células em 0,2 ml de solução isotônica na região pélvica de cada animal. Os animais inoculados com o tumor foram divididos em 4 grupos contendo 7 animais por grupo: 1) grupo controle positivo, inoculado com água destilada; 2) grupo controle negativo, inoculado com o quimioterápico Metotrexato (MTX) na concentração de 2,5 mg/kg; 3) grupo tratado com L-carvone 25 mg/kg; 4) grupo que recebeu a associação do L-carvone 25 mg/kg com uma dose reduzida do MTX (1,5 mg/kg). Os tratamentos foram realizados via intraperitoneal, com intervalos de 3 dias entre as aplicações sem que houvesse coincidência entre os compostos e o MTX. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12h/12h de claro e escuro, com livre acesso a água e alimento. A duração total do experimento foi de 21 dias a partir da indução do tumor sólido, nos quais a massa corporal e o tamanho do tumor foram aferidos com o auxílio de um paquímetro. Ao final dos 21 dias, os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais (i.p.) de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados. O sangue foi coletado da veia cava inferior em tubos contendo heparina. O volume tumoral ao longo dos 21 dias foi calculado utilizando a fórmula: $V = L \times W^2 \times 0,52$, onde L corresponde ao maior diâmetro e W corresponde ao menor diâmetro (MISHRA *et al.*, 2018). Os tumores e fígados foram coletados e armazenados para as análises posteriores. O sangue coletado foi centrifugado a $3.400 \times g$ por 5 minutos para a separação do plasma. Os níveis de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), glicose e creatinina no plasma foram avaliados utilizando kits comerciais (Kovalent, São Gonçalo, Brasil) em analisador automático (Mindray BS-200, Shenzhen, China) no Hospital Veterinário da UFPR (HV UFPR).

4.5.2 Análise Histopatológica dos Tumores

Para a preparação de lâminas histológicas, fragmentos dos tumores foram fixados em solução de formalina 10% em temperatura ambiente por 48 horas. Após

a fixação, o material foi desidratado utilizando incubações sucessivas com etanol e xilol e incluídos em blocos de parafina. Com o auxílio de um micrótomo, seção de 5 μm de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica. O material foi classificado em parâmetros histológicos como: a) Grau de necrose, subdivididos em quatro categorias (I – até 25%; II – entre 26 e 50%; III – entre 51 e 75%; e IV – maior do que 76%), (Souza *et al.* 2017); b) Presença de apoptose; c) Presença de inflamação e identificação de células inflamatórias. As imagens das lâminas foram obtidas em scanner de lâminas (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da Universidade Federal do Paraná.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE VEGF POR ELISA

A quantificação de VEGF presente no sobrenadante das linhagens tumorais expostas ou não ao L-carvone, e nos tumores extraídos dos camundongos foi realizado utilizando o protocolo *human VEGF DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent assay* kit (R&D Systems), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isto, 2×10^4 células foram incubadas por 48 horas na presença ou ausência de 100 nM de L-carvone. Para os tumores, aproximadamente 0,1 g foi homogeneizado em solução de fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5) e centrifugado a $9000 \times g$ por 20 minutos a 4 °C. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e utilizados nas análises. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços e a quantificação de VEGF foi realizada utilizando uma curva-padrão desta proteína, como recomendado pelo fabricante. A densidade óptica foi avaliada utilizando um leitor de microplaca (Dynatech Laboratories) em 450 nm com comprimento de onda de referência de 570 nm.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do *software GraphPad Prism* versão 6.04. As diferenças entre médias foram determinadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. A avaliação das imagens de imunofluorescência e do ensaio de

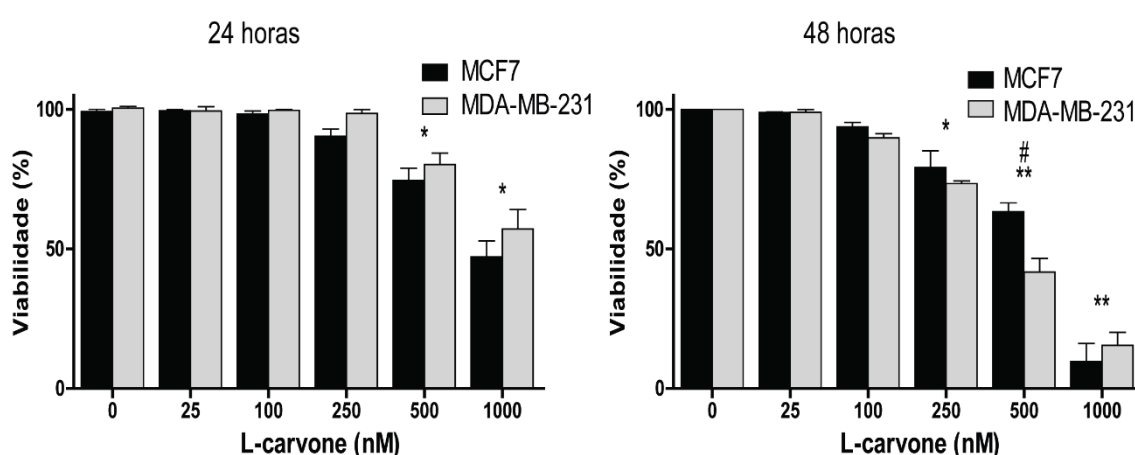
migração foi realizada utilizando o *software ImageJ*. Foram consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DO L-CARVONE

Para avaliar o efeito do L-carvone sobre a viabilidade celular, as linhagens tumorais de mama MCF7 e MDAMB-231 foram expostas a diferentes concentrações do composto (0, 25, 100, 250, 500 e 1000 nM) com tempos de incubação de 24 e 48 horas (FIGURA 6).

FIGURA 6 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR



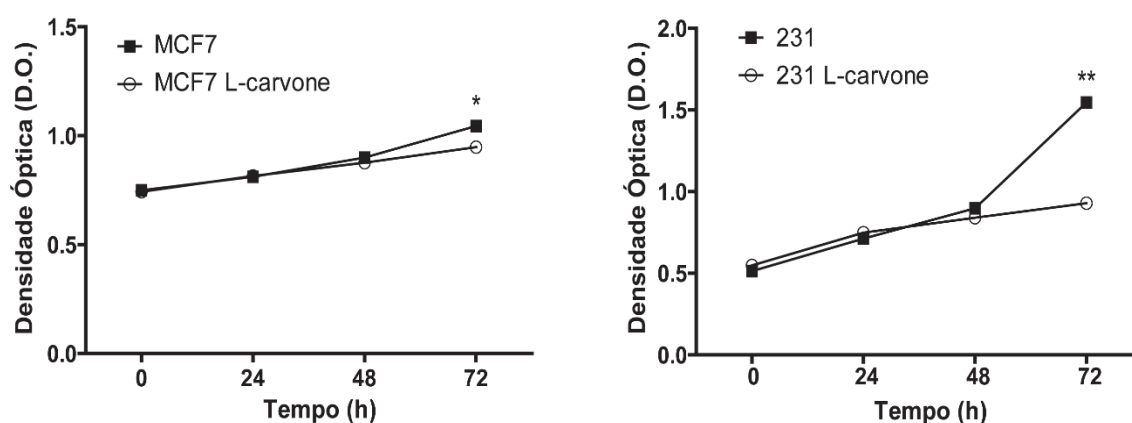
NOTA: As linhagens tumorais de mama MCF7 e MDAMB-231 foram expostas a diferentes concentrações de L-carvone e incubadas por 24 e 48 horas. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis em relação ao controle. O * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ para diferenças em relação ao controle. O # representa $p < 0,05$ para diferenças entre as linhagens.

Foi possível observar uma redução da viabilidade celular concentração e tempo-dependente nas células expostas ao L-carvone quando comparadas ao controle não tratado. Após 24 horas de incubação, a viabilidade de ambas as linhagens foi reduzida significativamente nas concentrações de 500 e 1000 nM, com uma redução média de 53% e 43,7% na concentração mais alta para a MCF7 e MDAMB-231, respectivamente. O tratamento por 48 horas provocou a redução nas concentrações acima de 250 nM, com a inibição máxima observada de 90,5% e 89,4% para a MCF7 e MDAMB-231, respectivamente. A única diferença observada entre as linhagens foi na concentração de 250 nM por 48 horas, na qual a MDAMB-231 apresentou uma redução mais acentuada. A partir da construção de curvas de dose-resposta, foram determinadas as concentrações inibitórias médias (CI50), que

corresponde a concentração necessária para reduzir a viabilidade em 50%. O valor encontrado foi de 670,8 nM para a MCF7 e 550,2 nM para a MDAMB-231.

Uma vez observado o efeito sobre a viabilidade, buscou-se avaliar se o L-carvone foi capaz de alterar a proliferação das células tumorais. Para isso, foi utilizado a coloração com cristal violeta (FIGURA 7). Considerando que o objetivo deste trabalho é avaliar alterações em dinâmicas celulares (migração, invasão e adesão), a concentração escolhida para os tratamentos seguintes foi de 100 nM, pois esta não apresentou redução da viabilidade em 48 horas.

FIGURA 7 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO POR CRISTAL VIOLETA



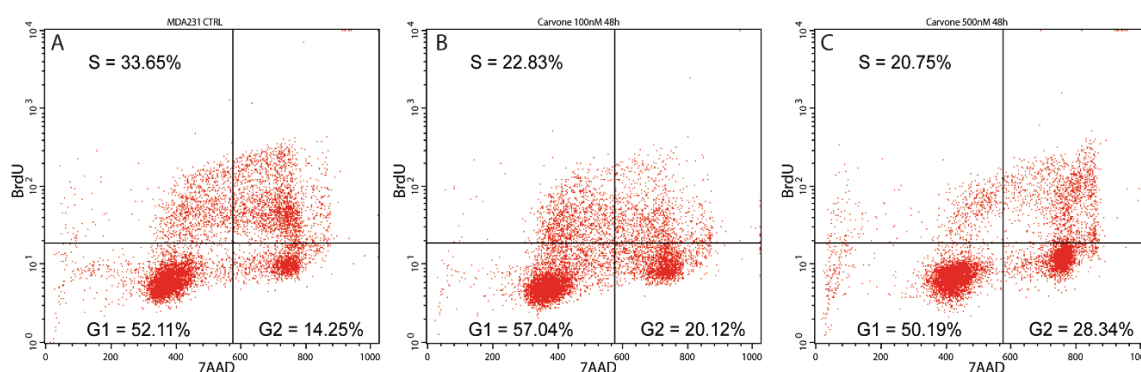
NOTA: As linhagens de mama foram expostas a 100 nM de L-carvone e incubadas por 24, 48 e 72 horas. Após, foram coradas com cristal violeta. Os gráficos representam os valores de absorbância. O * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

A partir da análise das curvas, foi possível observar que o L-carvone desempenhou um efeito antiproliferativo apenas nos tratamentos com duração de 72 horas, enquanto os tratamentos mais curtos não provocaram alterações significativas em comparação a células não tratadas. Em 72 horas, esta inibição da proliferação foi de 38,7% e 14,9% nas linhagens MCF7 e MDAMB-231, respectivamente.

Para compreender este efeito antiproliferativo, foi realizada a análise do ciclo celular por citometria de fluxo utilizando os marcadores bromodeoxiuridina (BrdU) e 7-amino-actinomicina (7-AAD). Nesta análise, o análogo de nucleotídeo BrdU é incorporado ao DNA durante a replicação da célula e detectado utilizando anticorpo específico. A marcação BrdU-positiva indica, portanto, que a célula passou pela fase S do ciclo celular durante o período de incubação com o composto. Já o 7-AAD é um

marcador para DNA total, utilizado simultaneamente para determinar a quantidade de DNA na célula, diferenciando assim as fases G0/G1 e G2/M do ciclo (FIGURA 8). Para as células tratadas com L-carvone a 100 nM, foram observados o aumento do número de células em G2/M e a diminuição de células na fase S do ciclo, entretanto, não foi observado efeito antiproliferativo nesta concentração através da coloração com cristal violeta. Já para a concentração de 500 nM, que é próxima do IC50 calculado para esta linhagem, o L-carvone provocou um acúmulo de células na fase G2/M, passando de 14,25% no controle para 20,12% e 28,34% nos tratamentos com 100 e 500 nM, respectivamente. Além disso, foi observada também a diminuição da população de células BrdU-positivas, indicando uma inibição da fase S do ciclo ou interferência no processo de síntese de DNA. Desta forma, pode-se relacionar o efeito antiproliferativo observado nesta concentração com a parada do ciclo celular na fase G2/M, inibindo a divisão celular.

FIGURA 8 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE O CICLO CELULAR



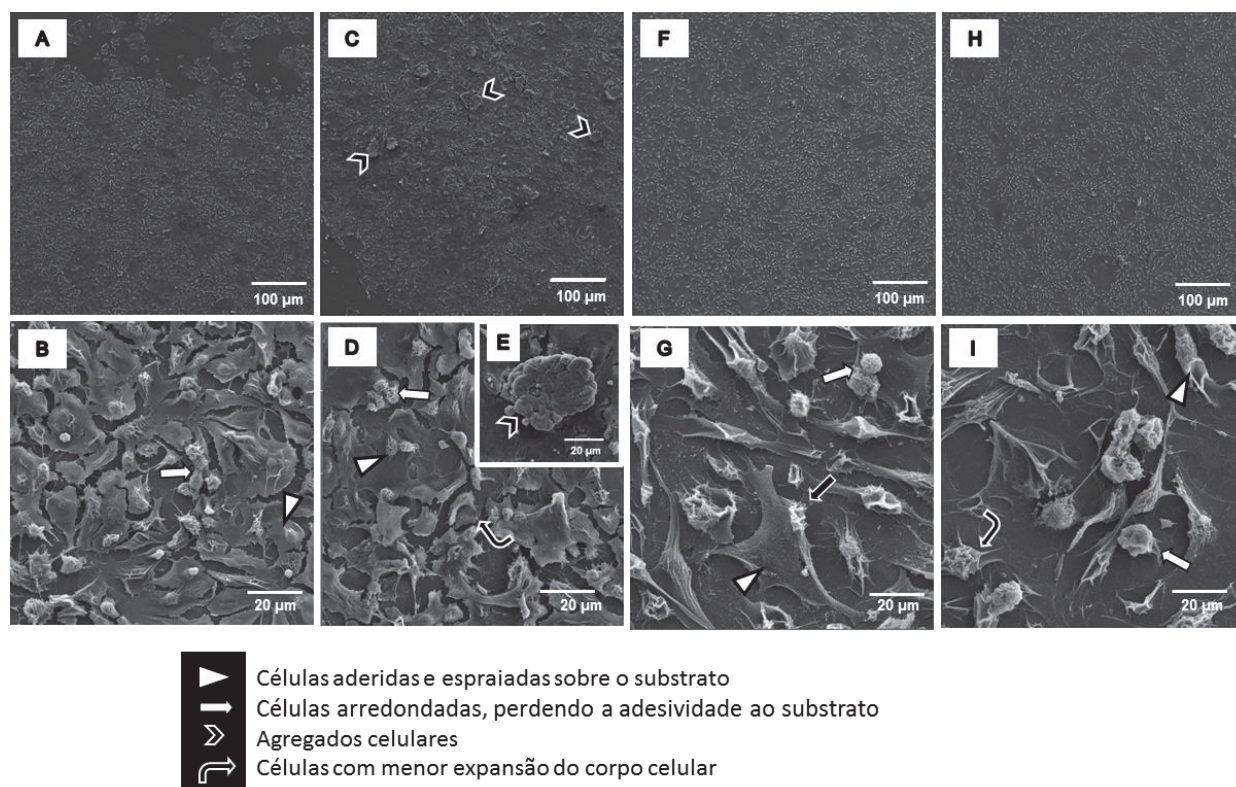
NOTA: Linhagem MDAMB-231 nas condições controle (A) e tratadas com L-carvone na concentração de 100 nM (B) e 500 nM (C) por 48 horas foram incubadas com BrdU e submetidas a marcação do DNA total por 7-AAD. Os gráficos representam as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular. BrdU – Bromodeoxiuridina; 7-AAD – 7-amino-actinomicina.

5.2 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR L-CARVONE

A análise por microscopia óptica das linhagens MDAMB-231 e MCF7 tratadas com L-carvone evidenciou alterações na morfologia celular das células expostas ao composto, quando comparadas com o controle (dados não mostrados). Com o objetivo de compreender estas modificações a nível ultraestrutural, foi realizada a

análise por microscopia eletrônica de varredura utilizando as linhagens MCF7 e MDAMB-231 nas condições controle e expostas a 100 nM de L-carvone por 48 horas (FIGURA 9). Nesta análise pode-se observar que as células da linhagem MCF7 não tratadas (A e B) apresentam-se aderidas e espreiadas sobre o substrato, com diferentes aspectos morfológicos. Na imagem de maior magnitude (B), é possível observar a presença de células arredondadas, indicando uma possível perda de adesão ao substrato. Após o tratamento (C e D), evidenciam-se em menor magnitude células aderidas e espreiadas sobre o substrato, entretanto, podem-se observar tanto células aderidas semelhantes às células não tratadas, quanto células com aspecto arredondado e diminuição na expansão do corpo celular. Observam-se ainda agregados formados de células justapostas (E), indicando uma maior ocorrência de adesão intercelular nestas células em relação ao controle. Para a linhagem MDAMB-231, foi observado um padrão semelhante do cultivo celular para as células controle (F e G) e expostas a L-carvone (H e I). Entretanto, as células controle (G) apresentam-se com maior expansão do corpo celular, mais aderidas e espreiadas sobre o substrato quando comparadas às tratadas com L-carvone (I).

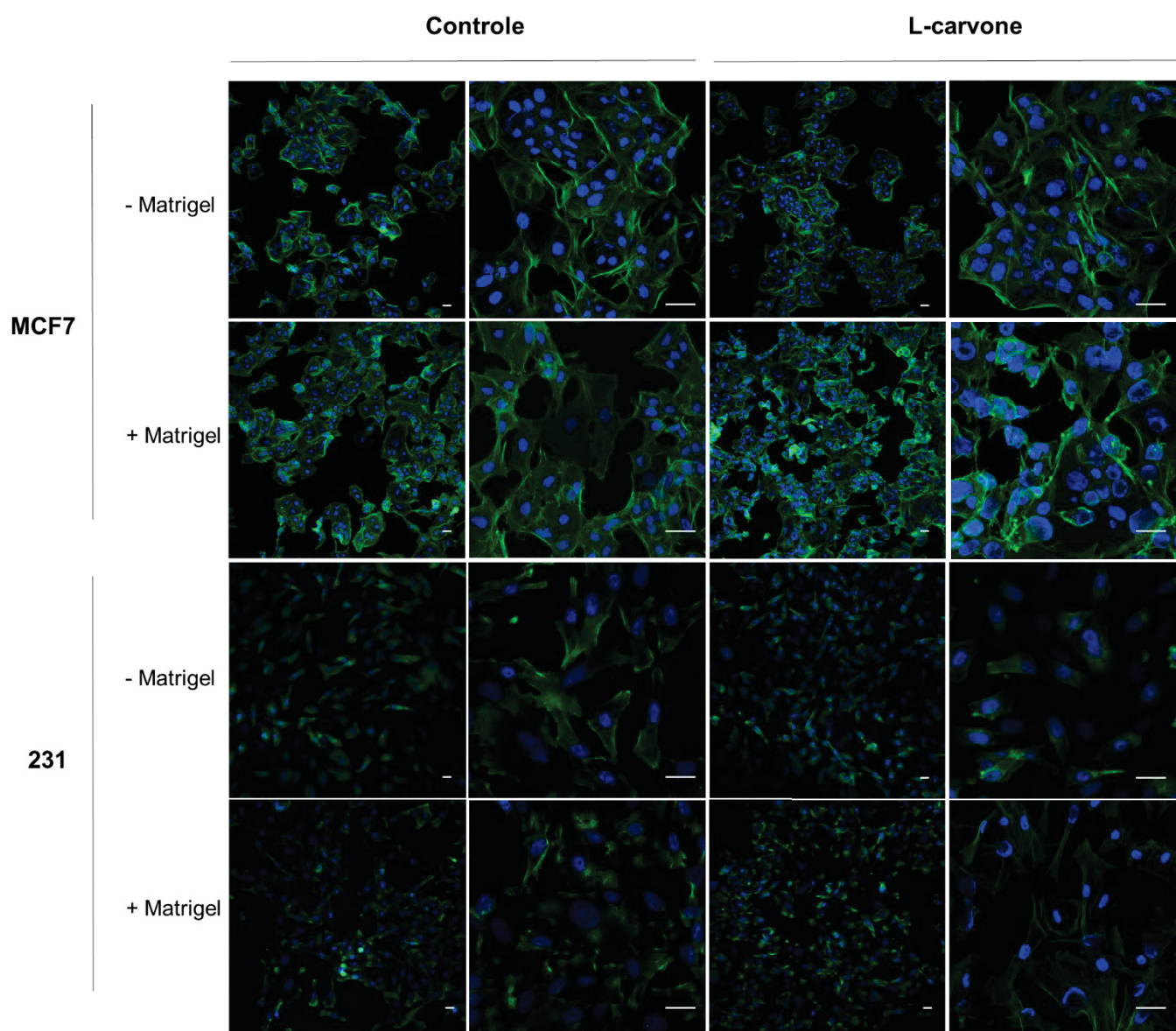
FIGURA 9 – ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS EXPOSTAS A L-CARVONE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

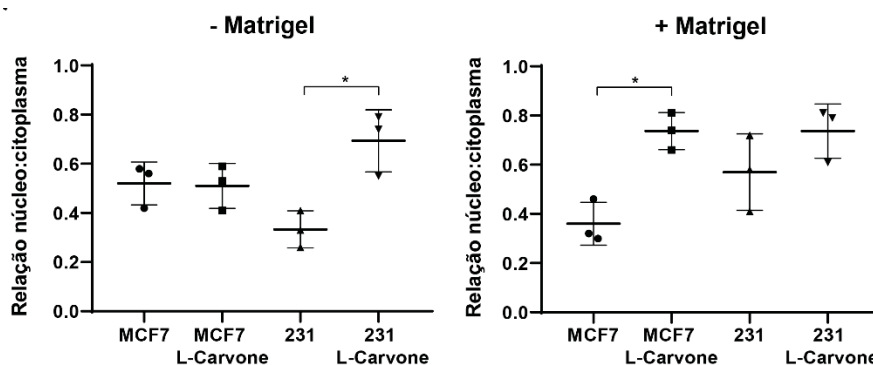


Nota: Imagens das linhagens MCF7 (A – D) e MDAMB-231 (F – I) nas condições controle (A, B, F e G) e tratadas com L-carvone a 100 nM por 48 horas (C, D, E, H e I) foram processadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. As imagens foram obtidas nas magnificações de 500x (acima) e 1500x (abaixo).

Uma vez observadas estas alterações estruturais nas células expostas ao L-carvone, buscou-se avaliar se essas modificações estavam relacionadas a organização do citoesqueleto (FIGURA 10). Para isso, os microfilamentos de actina de células das linhagens MCF7 e MDAMB-231 expostas ou não a L-carvone foram marcados com faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 e fotografados em microscopia confocal a laser.

FIGURA 10 – MARCAÇÃO DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA EXPOSTAS AO L-CARVONE





Nota: As imagens mostram a linhagem MCF7 (acima) e MDAMB-231 (abaixo) plaqueadas sobre lamínulas de vidro e sobre matrigel. São mostradas as condições controle (esquerda) e tratadas com L-carvone a 100 nM por 48 horas (direitas), evidenciando-se o núcleo marcado com DAPI (azul) e os microfilamentos de actina (verde). Barra de escala = 20 μ m. A relação núcleo: citoplasma foi analisada utilizando o software ImageJ (Q).

A linhagem MCF7 nas condições controle (A, B, E e F) e tratadas com 100 nM de L-carvone por 48 horas (C, D, G e H) foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (A – D) e sobre lamínulas recobertas com matrigel (E – H). Observam-se no controle (A e B) células aderidas ao substrato, com os microfilamentos de actina organizados em fibras de estresse. Observa-se nitidamente a formação do córtex submembranar de actina nestas células, com a presença de adesão intercelular. Para as células aderidas sobre o vidro, o tratamento não foi capaz de alterar a organização dos microfilamentos e as células apresentam padrão semelhante ao controle (C e D). Quando plaqueadas sobre o matrigel, as células se apresentaram aderidas e espalhadas sobre o substrato, com um nítido aumento da intensidade de marcação na condição controle (E e F). Essas células apresentam uma maior expansão do corpo celular e é possível observar a formação das fibras de estresse. No tratamento com L-carvone na presença de matrigel (G e H), observa-se de forma evidente a diminuição da expansão do corpo celular e o aumento de células justapostas, o que favorece a formação de agregados celulares pela interação intercelular característica desta linhagem.

Para a linhagem MDAMB-231, as células controles plaqueadas sobre lamínulas de vidro se apresentam aderidas ao substrato e espalhadas, com o citoesqueleto de actina organizado e apresentando diferentes morfologias e projeções do corpo celular (I e J). O tratamento com L-carvone provocou uma diminuição da intensidade de marcação decorrente da menor expansão do corpo celular (K e L). Evidencia-se ainda que as células tratadas com L-carvone (L) apresentam menor organização dos microfilamentos de actina quando comparadas

ao controle (J). Quando plaqueadas sobre o matrigel, observa-se um maior número de células aderidas ao substrato, porém, com padrão semelhante de organização do citoesqueleto e de expansão do corpo celular comparado às células plaqueadas em lamínulas (M). Após o tratamento, observam-se células com menor expansão do corpo celular, com a redução das fibras de estresse, embora estas ainda estejam presentes nas células (O e P).

A partir das imagens, foi possível calcular a razão núcleo:citoplasma das células (FIGURA 10Q), avaliando-se assim a expansão do corpo celular. Observa-se que, para o plaqueamento na ausência de matrigel, a razão núcleo:citoplasma apresentou-se elevada nas células MDAMB-231 expostas ao L-carvone em relação ao controle. Isto indica uma menor expansão do corpo celular nestas células. Já para a linhagem MCF7, um efeito semelhante foi observado apenas quando as células foram plaqueadas sobre matrigel, condição na qual houve o aumento da relação núcleo:citoplasma em células tratadas em relação ao controle. Estes dados concordam com a análise visual das imagens, indicando que a exposição ao L-carvone influencia não apenas a organização dos microfilamentos de actina, mas também no tamanho das células. Além disso, as alterações observadas na presença do matrigel sugerem que o L-carvone é capaz de interferir na interação das células com componentes da MEC.

5.3 INFLUÊNCIA DO L-CARVONE SOBRE AS DINÂMICAS CELULARES EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Para os ensaios funcionais, foram utilizados tratamentos com 100 nM de L-carvone por 48 horas, evitando assim um efeito citotóxico desta molécula que pudesse interferir nas dinâmicas celulares.

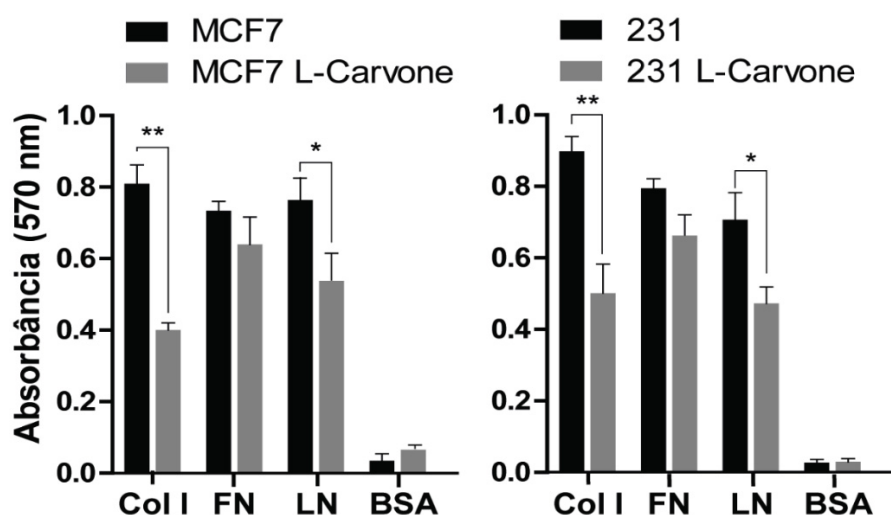
5.3.1 Ensaio de adesão celular

A interação das células com a matriz extracelular está envolvida em diversas etapas da metástase, desde a invasão do tecido adjacente, até o seu estabelecimento no novo ambiente a ser colonizado. O ensaio de adesão celular foi realizado com o objetivo de verificar o efeito do L-carvone na adesão das células

tumorais às proteínas de adesão presentes no microambiente tumoral como o colágeno, fibronectina e laminina (FIGURA 11).

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o tratamento com L-carvone inibiu em aproximadamente 50% e 42% a adesão das células MCF7 e MDAMB-231, respectivamente, ao colágeno I. Esta diminuição também foi evidenciada em células plaqueadas sobre a laminina, com uma redução de 25% na MCF7 e 28% na MDAMB-231 quando comparadas às células não tratadas. Neste ensaio, foram realizados dois controles, um positivo com células sem tratamentos sobre as proteínas de adesão, e o controle negativo utilizando BSA uma proteína sem função adesiva sobre as células. Evidenciou-se ainda que não foram observadas alterações significativas na adesão das células à fibronectina.

FIGURA 11 – EFEITO DO L-CARVONE SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA AOS COMPONENTES COMUNS DA MEC



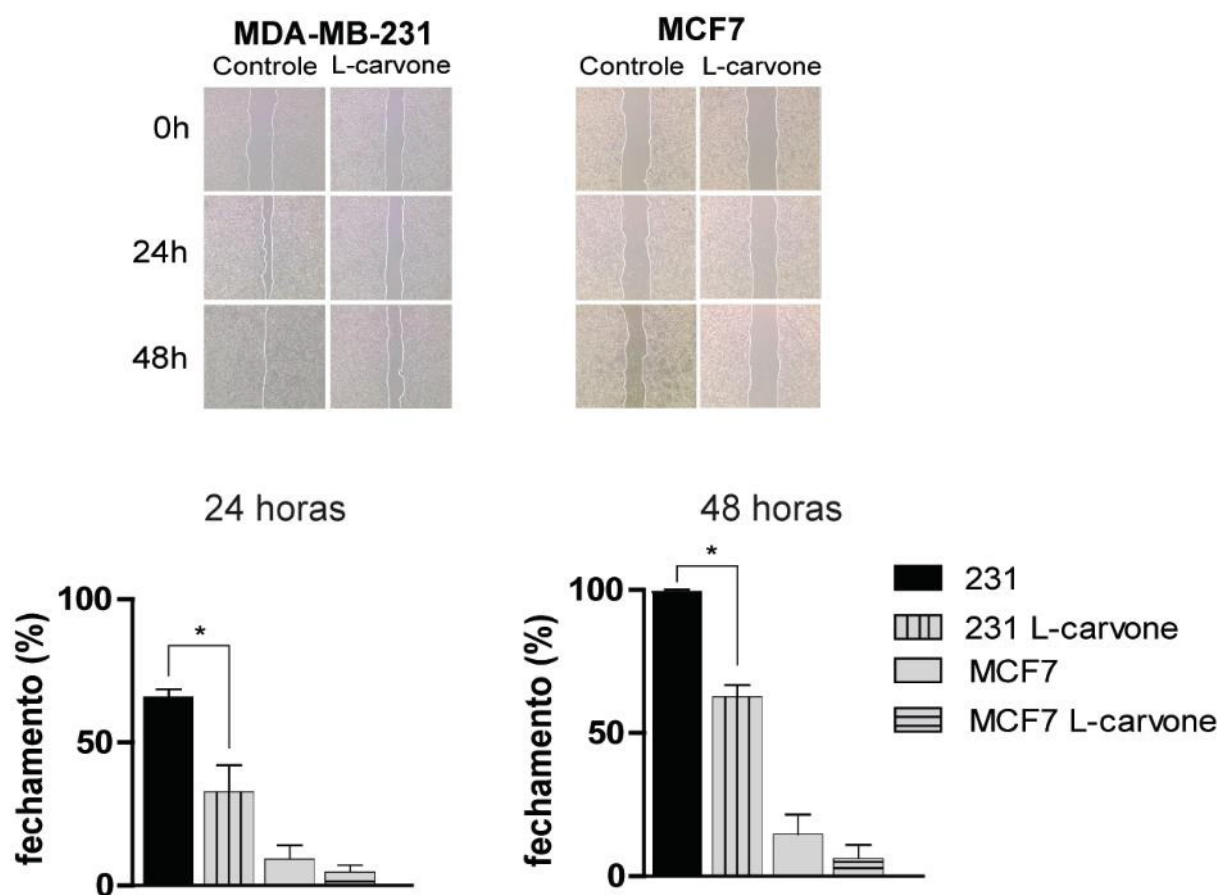
NOTA: As linhagens MCF7 (esquerda) e MDAMB-231 (direita) previamente tratadas com L-carvone a 100 nM por 48 horas e submetidas a ensaio de adesão por 2 horas em placas pré-incubadas com colágeno tipo I (Col I), fibronectina (FN) e laminina (LN). Os gráficos representam os valores de absorbância obtidos após coloração com cristal violeta e eluição em ácido acético a 33%. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle negativo para a adesão celular. O * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.3.2 Ensaio de migração celular

Além da adesão a MEC, a progressão tumoral depende da capacidade de movimentação das células, por exemplo, durante a migração através do estroma na disseminação metastática. O ensaio de migração pelo método do *wound healing* (ou

scratch) foi realizado em células tratadas ou não com L-carvone (FIGURA 12). Os resultados permitiram observar que o L-carvone inibiu significativamente a migração das células MDAMB-231, condição esta diferente das células controle. A capacidade migratória destas células foi inibida em aproximadamente 33% após 24 horas e 38% em 48 horas, quando comparadas às células não tratadas. Para a linhagem MCF7, que não apresenta um comportamento pouco migratório em relação a MDA-MB-231, não foram observadas diferenças significativas entre as condições testadas. De maneira interessante, estes resultados demonstram que o L-carvone inibiu a migração celular na concentração de 100 nM, na qual não foi observado efeito sobre a proliferação celular.

FIGURA 12 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS EXPOSTAS AO L-CARVONE

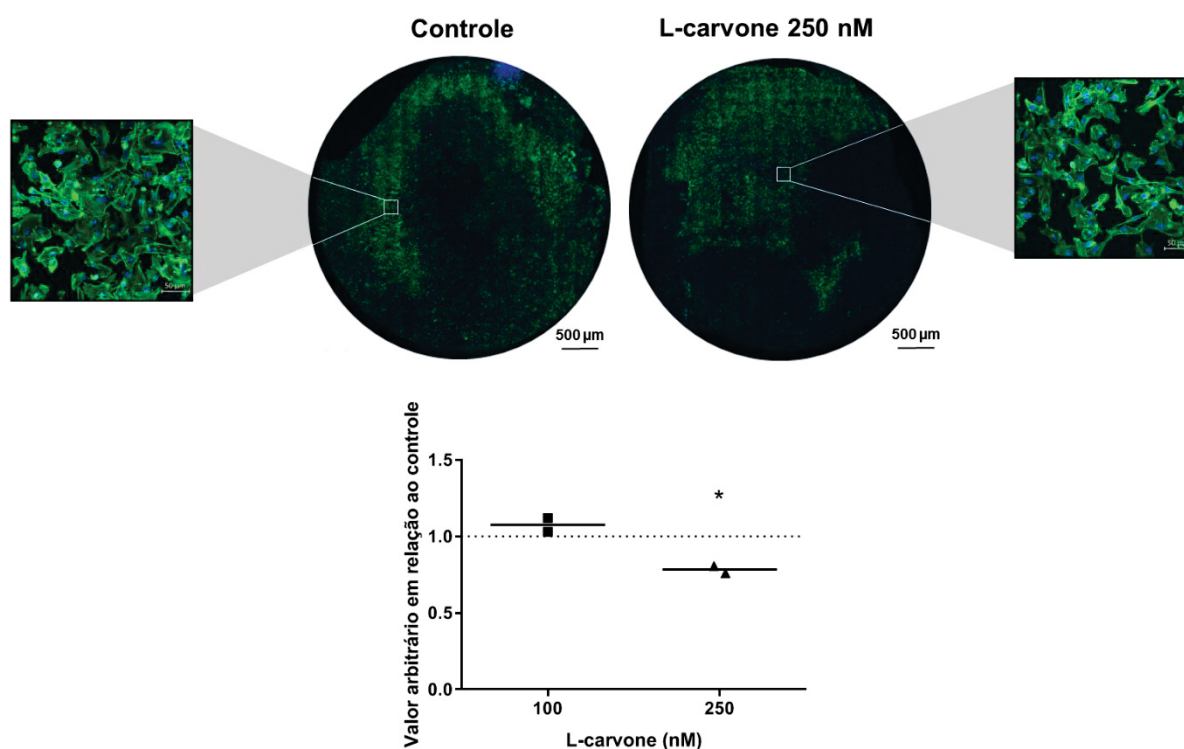


NOTA: As linhagens MCF7 e MDAMB-231 foram tratadas previamente com 100 nM de L-carvone por 48 horas, e então foi realizada a fenda que foi fotografada após 24 e 48 horas. O fechamento da ferida foi determinado utilizando o software ImageJ a partir da análise das fotomicrografias (representadas acima). Os gráficos representam o fechamento da fenda (% do controle) em 24 horas (esquerda) e 48 horas (direita). O * representa $p < 0,05$.

5.3.3 Ensaio de invasão celular *transwell*

Para avaliar a capacidade invasiva das células MDAMB-231, as células foram tratadas com L-carvone 100 e 250 nM por 48 horas, ou não, e foram plaqueadas em poços de *transwell* revestidos com matrigel e incubadas por 24 horas para a invasão. Após esse período, a membrana foi corada com DAPI e *ActinGreen 488 ReadyProbes*, evidenciando-se o núcleo (azul) e os microfilamentos de actina (verde) das células (FIGURA 13). A partir da contagem de núcleos, foi possível observar uma diminuição significativa da invasão nas células tratadas com L-carvone 250 nM, mas não na concentração de 100 nM, em relação ao controle.

FIGURA 13 – ENSAIO D E INVASÃO EM TRANSWELL DA LINHAGEM MDA-MB-231 EXPOSTA A L-CARVONE



Nota: A linhagem MDAMB-231 foi tratada com 100 ou 250 nM de L-carvone por 48 horas e plaqueadas em poços *transwell*. Após 24 horas de incubação, as células que invadiram foram fixadas em PFA 2% e marcadas com *ActinGreen 488 ReadyProbes* (verde) e DAPI (azul). A contagem de células nas membranas foi realizada utilizando o software ImageJ e os valores estão demonstrados no gráfico. O * indica $p < 0,05$ em relação ao controle.

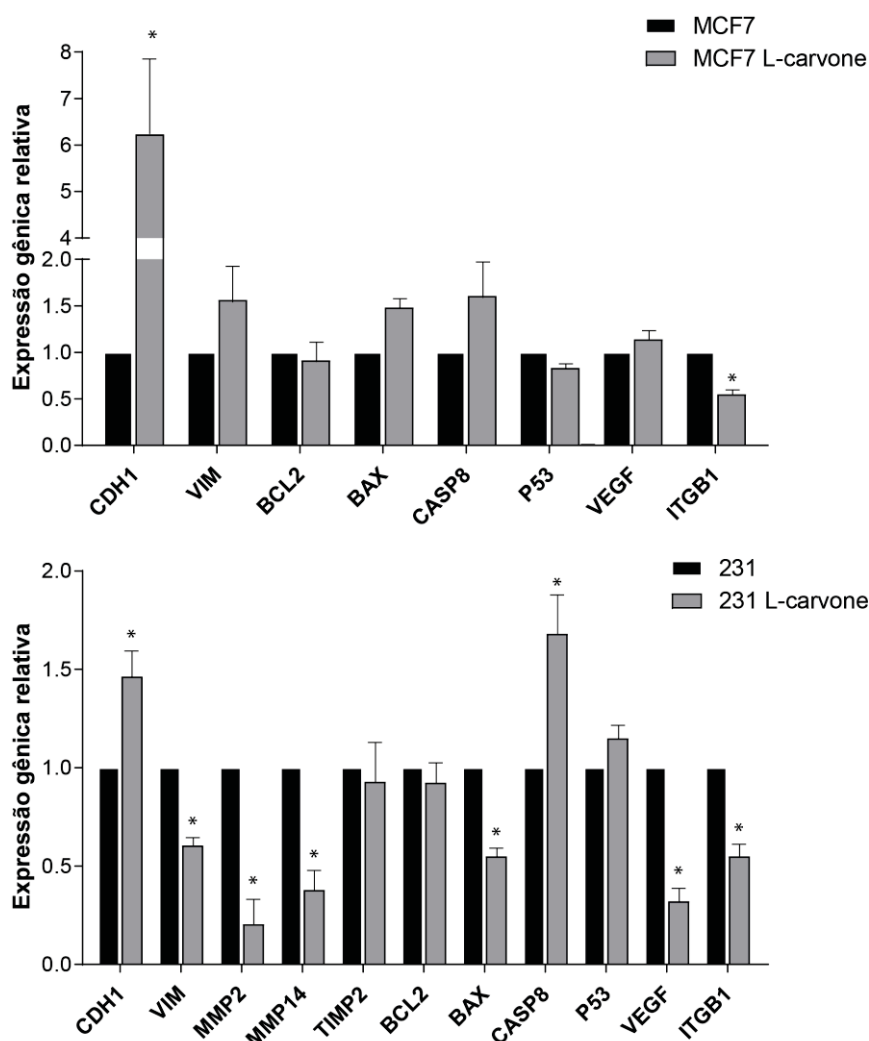
5.4 EFEITOS DO L-CARVONE SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A METÁSTASE

A fim de compreender os mecanismos moleculares envolvidos com as alterações funcionais observadas nas células, foi realizada a análise da expressão do RNA mensageiro (RNAm) de diversos genes relacionados com a progressão tumoral e metástases (FIGURA 14). Foram analisados genes relacionados a adesão celular (*ITGB1* – Integrina β 1); transição epitélio-mesênquima (*CDH1* – E-caderina e *VIM* – vimentina); invasão (*MMP2* – metaloproteinase de matriz 2, *MMP-14* – metaloproteinase de matriz 14 e *TIMP2* – inibidor tecidual de MMP-2); apoptose (anti: *Bcl2* e pró-apoptóticos: *Bax*, *Casp8* e *TP53*) e angiogênese (*VEGF* – Fator de crescimento vascular endotelial). O tratamento das células com L-carvone foi realizado na concentração de 100 nM por 48 horas.

Na linhagem MCF7, foi observado o aumento significativo da expressão gênica de *CDH1* e diminuição de *ITGB1* nas células tratadas com L-carvone em relação ao controle. Esta linhagem possui fenótipo epitelial, evidenciado principalmente pela expressão de E-caderina, um dos melhores marcadores prognósticos. Estas células não apresentaram a expressão das MMPs avaliadas, o que também está relacionada a seu fenótipo não-invasivo.

A linhagem MDAMB-231 apresentou alterações nos genes estudados, com o aumento de *CDH1* e caspase-8 e a diminuição de *VIM*, *MMP2*, *MMP14*, *BAX*, *VEGF* e *ITGB1*. A expressão aumentada de marcadores epiteliais, como a de E-caderina, quando associada a diminuição de marcadores mesenquimais pode estar relacionada com os efeitos observados na migração celular, bem como a diminuição na expressão das MMPs, o que leva à inibição da invasão tumoral, também observada nos ensaios funcionais. A regulação do *VEGF*, apesar de acontecer apenas na linhagem triplo-negativa, é uma evidência de que o composto pode ser capaz de modular vias de ativação da angiogênese tumoral. Em conjunto, estes dados permitiram direcionar a investigação para possíveis alvos moleculares alterados pelo tratamento com L-carvone.

FIGURA 14 – RT-qPCR DE GENES RELACIONADOS AO CÂNCER EM CÉLULAS TUMORAIS EXPOSTAS AO L-CARVONE

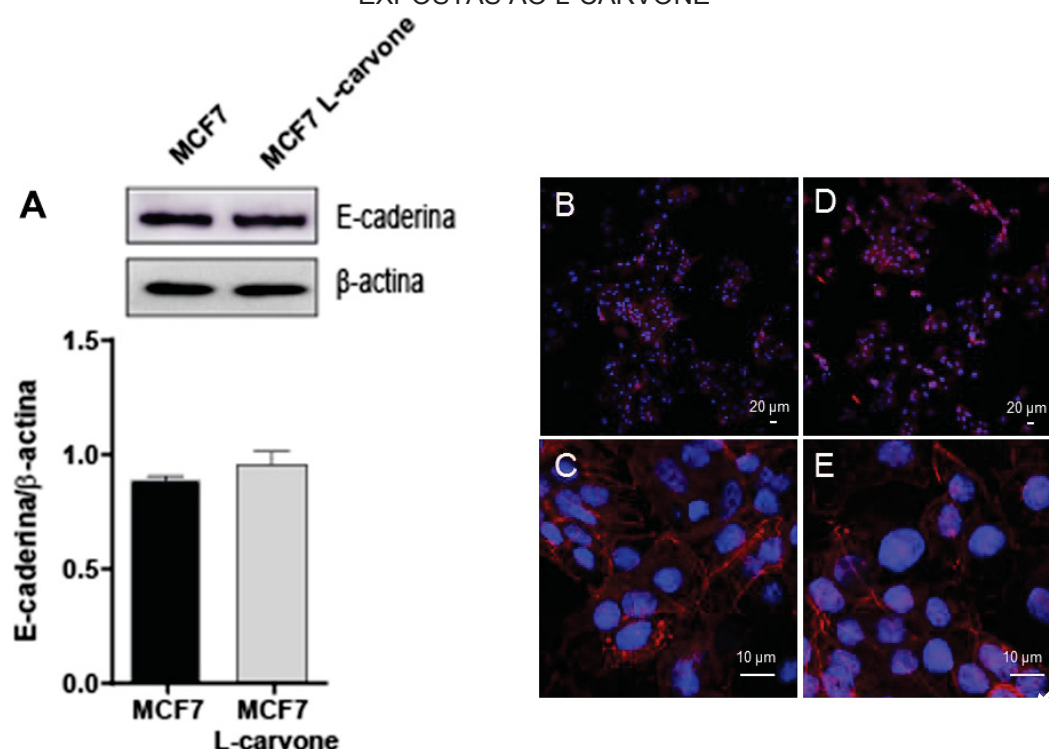


NOTA: A análise de expressão gênica foi realizada por RT-qPCR e a análise pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os gráficos representam a expressão de genes relacionados a adesão celular, a transição epitélio-mesênquima, a invasão, a apoptose e a angiogênese nas linhagens MCF7 (acima) e MDAMB-231 (em baixo). O * representa $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.5 EFEITO DO L-CARVONE NA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA

Uma vez que foi detectado o aumento da expressão do RNAm de *CDH1*, gene que codifica a proteína de adesão intercelular E-caderina, buscou-se avaliar o efeito do tratamento com L-carvone a 100 nM por 48 horas sobre a adesão célula-célula na linhagem MCF7. Para isso, a expressão e localização celular da E-caderina foi avaliada por *western blotting* e imunofluorescência, respectivamente (FIGURA 15).

FIGURA 15 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM MCF7 EXPOSTAS AO L-CARVONE



NOTA: A expressão de E-caderina na linhagem MCF7 foi avaliada por *western blotting* (A) e imunofluorescência (B – E). O gráfico corresponde a relação entre as bandas visualizadas entre tratados e controles, normalizados com β -actina utilizando o software ImageJ. Para isso, monocamadas de células foram crescidas sobre lâminulas nas condições controle (B e C) e expostas a 100 nM de L-carvone por 48 horas (D e E). Posteriormente, foram processadas para imunofluorescência usando o anticorpo anti-E-caderina (vermelho). As imagens foram obtidas em magnificação de 200x (B e D) e 600x (C e E) em microscópio confocal de varredura a laser. O núcleo foi marcado com DAPI (azul).

A partir do ensaio de *western blotting*, foi possível concluir que o L-carvone não foi capaz de alterar a expressão da proteína E-caderina na linhagem MCF7 quando comparado ao controle. Já a linhagem MDAMB-231 não apresenta a expressão deste marcador, o que também não foi alterado após o tratamento. Na Figura 15C, observa-se o perfil de marcação da E-caderina em células não-tratadas, com a proteína presente nas membranas celulares em regiões de contato célula-célula. Esse padrão de marcação não foi alterado nas células expostas ao L-carvone, entretanto, pode-se observar na imagem de maior magnitude (FIGURA 15E) a formação de agregados celulares semelhantes aos observados na microscopia eletrônica de varredura, indicados pela seta (FIGURA 9E). Portanto, foi possível concluir que, apesar do aumento dos níveis do transcrito do gene *CDH1* em resposta ao tratamento, este não foi capaz de modificar a expressão proteica de E-caderina.

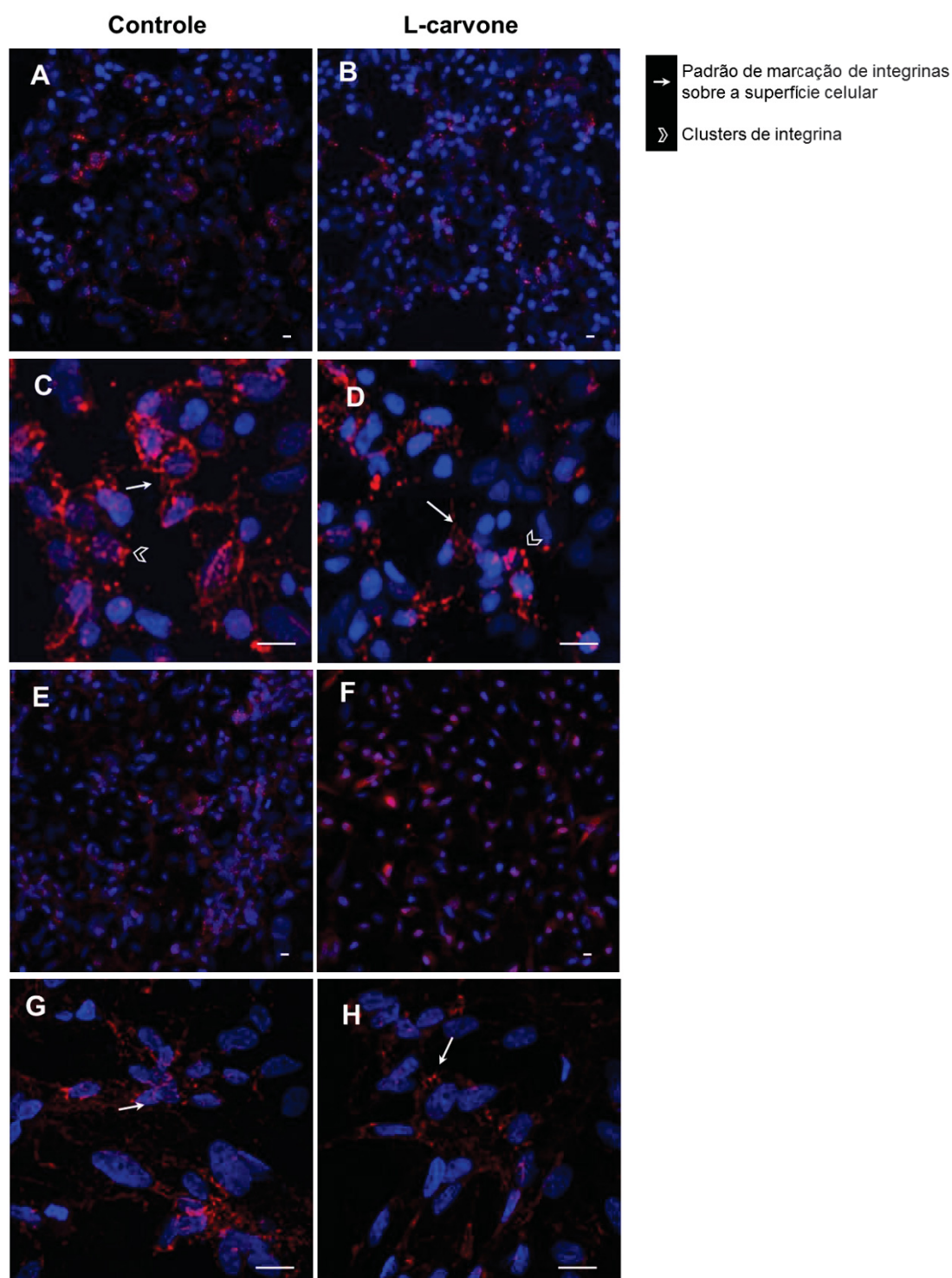
5.6 INFLUÊNCIA DO L-CARVONE SOBRE A SINALIZAÇÃO DE INTEGRINA

Considerando que as células tratadas com L-carvone apresentaram uma menor capacidade de adesão às proteínas de matriz extracelular (FIGURA 11) e que os tratamentos provocaram alterações na morfologia e estrutura celular, buscou-se compreender se o L-carvone é capaz de modular os receptores de membrana responsáveis por essas interações.

Uma das alterações na expressão gênica observadas após o tratamento com L-carvone foi a diminuição da transcrição de *ITGB1*, que codifica para a proteína integrina $\beta 1$ (FIGURA 14). Sendo assim, foi realizada a imunomarcação deste receptor nas linhagens MCF7 e MDAMB-231 tratadas com 100 nM de L-carvone por 48 horas (FIGURA 16). Para a linhagem MCF7, observou-se no controle (C) um padrão de marcação positiva para toda a extensão do citoplasma celular. Pode-se também observar que, em alguns pontos, há uma maior intensidade desta marcação, sugerindo clusterização destes receptores. Quando expostas ao L-carvone (B e D), observa-se o mesmo padrão de marcação composto por proteínas difusas e clusterizadas. Entretanto, a menor intensidade de marcação sugere uma diminuição na presença deste receptor.

Para a linhagem MDAMB-231 (E e G), também é possível observar marcação positiva por toda a extensão da superfície celular. O padrão de marcação é difuso e não são observados *clusters*. As células mostram-se aderentes ao substrato com expansão do seu corpo celular. Semelhante padrão de marcação pode ser observado após o tratamento com o L-carvone e a diminuição da intensidade de marcação nas células tratadas em relação ao controle é sutil (F e H). Com esta técnica, pode-se concluir que o L-carvone não altera a localização celular das moléculas de integrina, entretanto, parece alterar a quantidade destas na membrana plasmática.

FIGURA 16 – IMUNOMARCAÇÃO DE INTEGRINA β_1 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA EXPOSTAS AO L-CARVONE

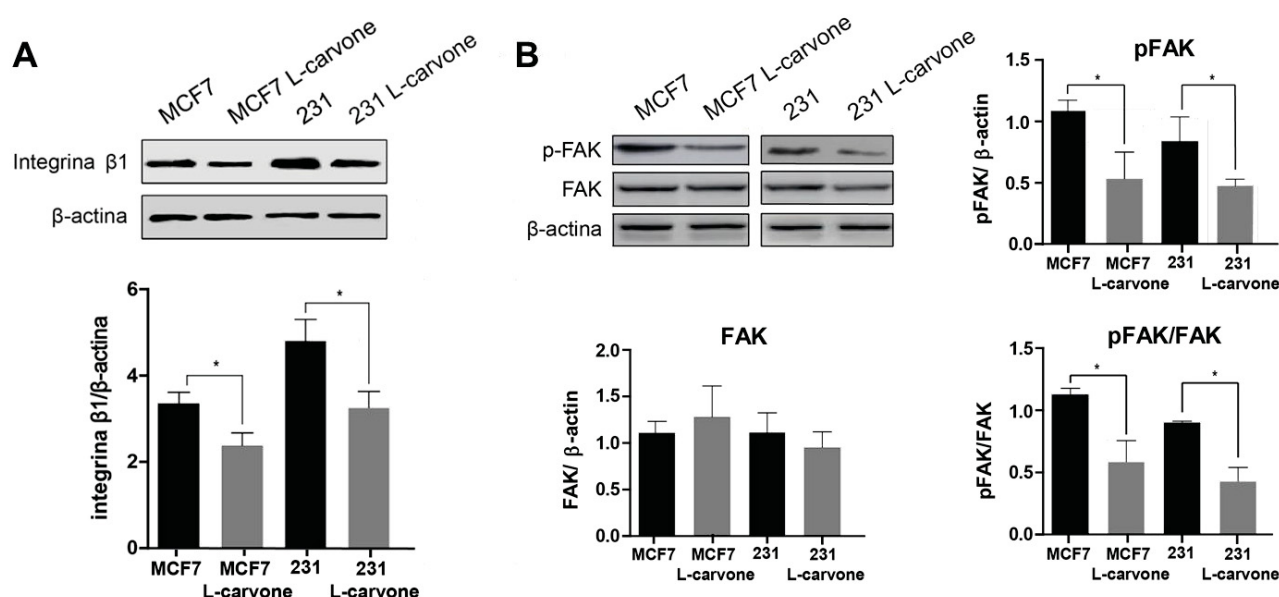


NOTA: Análise por imunofluorescência do receptor integrina β_1 em microscopia confocal a laser nas linhagens MCF7 (A – D) e MDAMB-231 (E – H). Células controle (A, C, E, e G) e tratadas com 100 nM de L-carvone (B, D, F e H) foram fotografadas em magnificação de 200x (A, B, E e F) e 1200x (C, D, G e H). As imagens mostram a localização da integrina (vermelho) e o núcleo corado com DAPI (azul). Barra de escala de 20 μm .

A ligação das integrinas às proteínas da matriz extracelular, além de propiciar a adesão da célula ao tecido adjacente, leva a ativação de vias de transdução de

sinal que resultam na disseminação metastática. Entre as proteínas ativadas neste processo, destaca-se a quinase de adesão focal (FAK), que é fosforilada em resposta a ligação e ativação da integrina, e provoca a reorganização do citoesqueleto, facilitando a migração e invasão das células. A avaliação quantitativa de integrina $\beta 1$ e de FAK total ou ativo (p-FAK) em células tratadas e não tratadas foi realizada através de *western blotting* (FIGURA 17).

FIGURA 17 – EXPRESSÃO DE INTEGRINA $\beta 1$, FAK E pFAK NAS CÉLULAS TRATADAS COM L-CARVONE



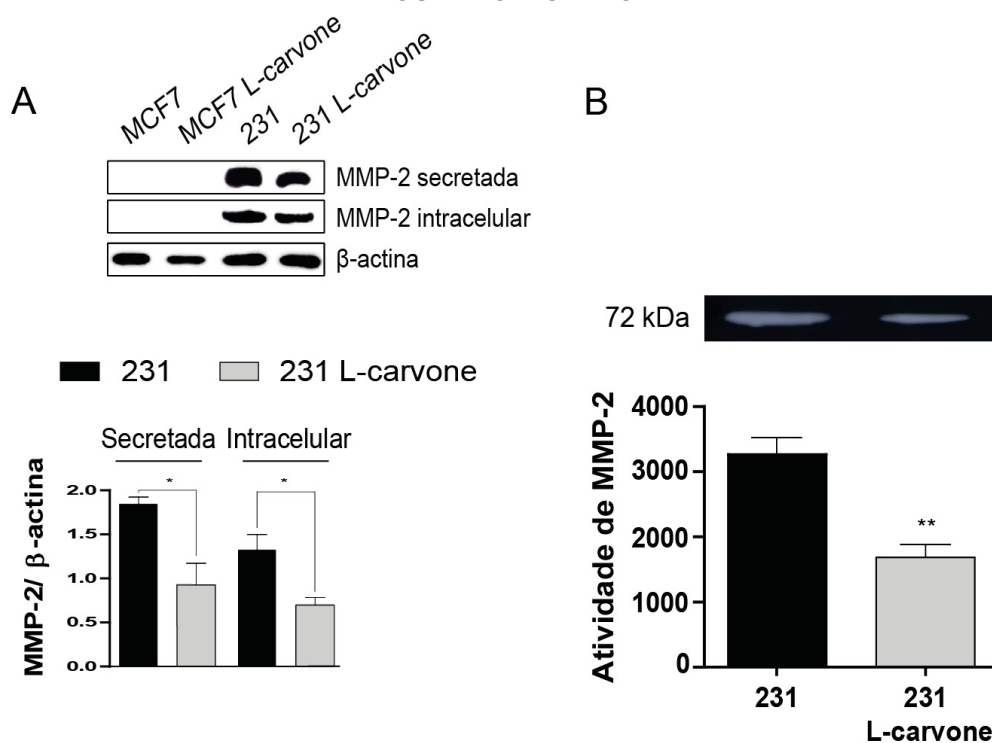
NOTA: Avaliação da expressão de integrina $\beta 1$ (A) e das formas total e fosforiladas (Y397) de FAK (B) por western blotting nas linhagens MCF7 e MDAMB-231 expostas a 100 nM de L-carvone por 48 horas. A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ e as bandas foram padronizadas em relação a banda de β -actina. O * representa $p < 0,05$.

Em ambas as linhagens, pode-se observar uma diminuição de integrinas em resposta ao tratamento, sendo este efeito mais evidente na linhagem MDAMB-231 exposta ao L-carvone quando comparada às células controle (FIGURA 17A). Isto corrobora os resultados de imunofluorescência que indicavam a diminuição deste receptor. Pode-se observar também que o tratamento com L-carvone não provocou alterações na quantidade total de FAK nas células, entretanto, diminuiu a forma fosforilada desta proteína (FIGURA 17B). Em conjunto, estes resultados sugerem que o monoterpene avaliado é capaz de regular negativamente a via de transdução de sinal integrina/FAK através da diminuição da adesão celular, o que está relacionado aos efeitos observados sobre a migração e invasão celular.

5.7 REGULAÇÃO DE MMP-2 EM CÉLULAS EXPOSTAS AO L-CARVONE

A metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) é um dos principais marcadores de malignidade do câncer de mama, estando relacionado principalmente ao processo invasivo devido a sua alta atividade de degradação de MEC. Visto que o tratamento com L-carvone foi capaz de diminuir o potencial invasivo das células (FIGURA 13) e a expressão do RNAm deste gene (FIGURA 14), avaliou-se a expressão e a atividade desta proteína em células controle e tratadas com L-carvone a 100 nM por 48 horas (FIGURA 18).

FIGURA 18 – EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2 NA LINHAGEM MDAMB-231 EXPOSTA AO L-CARVONE



NOTA: A linhagem MDAMB-231 foi tratada com 100 nM de L-carvone por 48 horas. O sobrenadante e o extrato de proteínas totais das células cultivadas foram analisados por *western blotting* para a presença de MMP-2 (A). A avaliação da atividade gelatinolítica da proteína foi realizada por zimografia (B). As bandas correspondem a degradação da gelatina. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ. O * representa $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$.

Os resultados de *western blotting* demonstraram que o tratamento provocou a diminuição de MMP-2 tanto no meio intracelular, quanto a secretada presente no sobrenadante do cultivo celular ao longo das 48 horas de tratamento (FIGURA 18A). Este resultado é importante, pois a MMP-2 é produzida e secretada na sua forma inativa e só é ativada através de clivagem proteolítica no meio extracelular. Para avaliar a atividade desta proteína, empregou-se a técnica da zimografia em gel de

poliacrilamida contendo gelatina como substrato. A Figura 18B mostra as bandas provenientes da degradação da gelatina, na qual é possível observar que a atividade gelatinolítica de MMP-2 encontra-se reduzida em células expostas ao L-carvone quando comparadas ao controle. Estes dados sugerem que os efeitos observados no ensaio de invasão decorrem da inibição de MMP-2, o que diminui a capacidade de degradação da MEC e, conseqüentemente, reduz a invasividade da linhagem MDAMB-231.

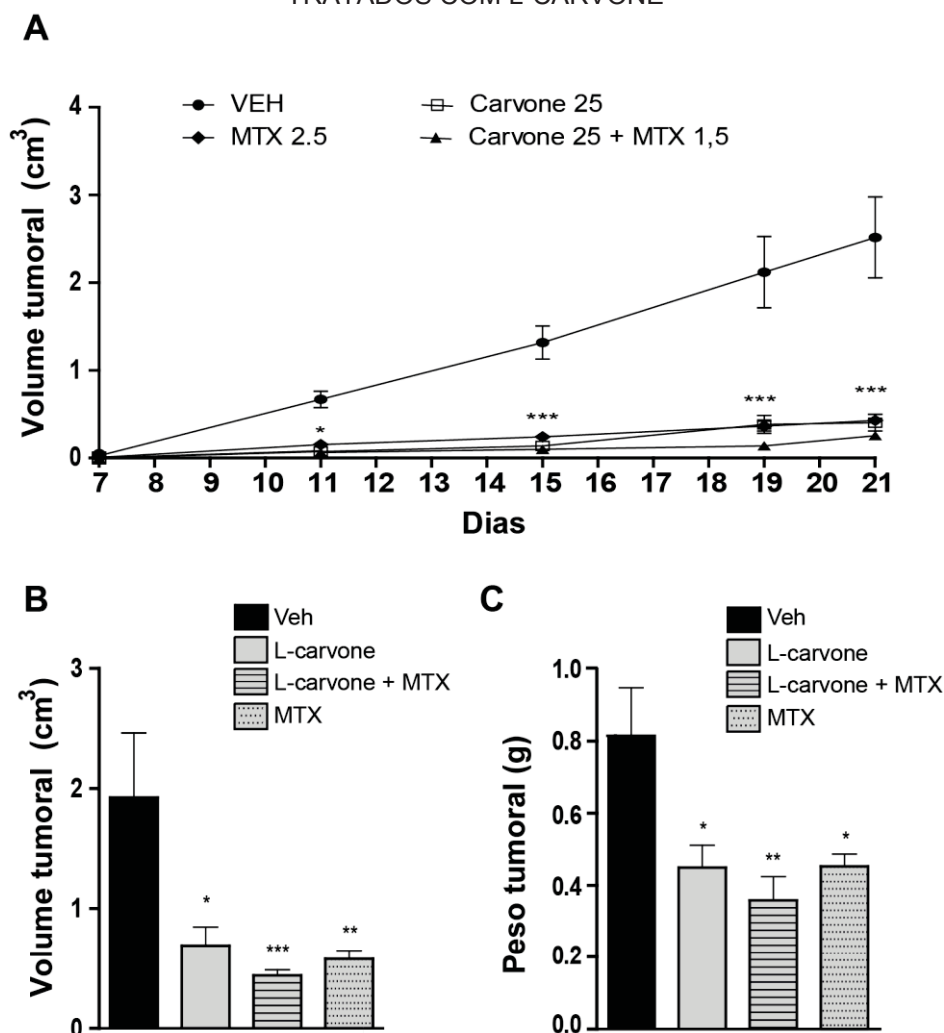
5.8 EFEITOS ANTITUMORAIS DO L-CARVONE *IN VIVO*

5.8.1 Crescimento tumoral

A atividade antitumoral *in vivo* do L-carvone foi determinada utilizando o modelo de carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os animais foram divididos em quatro grupos e tratados com: água destilada (veículo); L-carvone 25 mg/kg; o quimioterápico metotrexato (MTX) 2,5 mg/kg; e L-carvone 25 mg/kg combinado com uma dose reduzida de MTX (1,5 mg/kg). O volume tumoral foi medido a partir do sétimo dia até o final do tratamento, quando os animais foram eutanasiados e os tumores coletados foram avaliados quanto ao peso e volume (FIGURA 19).

Ambos os grupos que receberam L-carvone demonstraram uma redução significativa do volume tumoral a partir do dia 15, bem como o grupo tratado apenas com MTX. A partir deste dia, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos L-carvone, L-carvone associado ao MTX e MTX (FIGURA 19A). O volume, por sua vez, teve uma média de $1,92 \pm 0,53 \text{ cm}^3$ no veículo, $0,69 \pm 0,15 \text{ cm}^3$ no grupo L-carvone e $0,43 \pm 0,04 \text{ cm}^3$ no grupo que recebeu a combinação. O peso e volume tumoral após os 21 dias também foram significativamente reduzidos em todos os grupos testados em relação ao veículo (FIGURA 19B). O peso médio foi de $0,81 \pm 0,13 \text{ g}$ veículo para $0,45 \pm 0,10 \text{ g}$ e $0,35 \pm 0,06 \text{ g}$ nos grupos L-carvone e L-carvone associado ao MTX, respectivamente (FIGURA 19C). A inibição do crescimento tumoral foi calculada baseada no volume tumoral aferido ao último dia do tratamento, com valor correspondente a 30,9% para o tratamento apenas com 25 mg/kg de L-carvone. A combinação L-carvone e MTX apresentou uma taxa de inibição de 56,1%, um valor maior do que o de 49,4% observado para o grupo MTX.

FIGURA 19 – VOLUME E PESO DOS TUMORES DE EHRLICH EM ANIMAIS TRATADOS COM L-CARVONE



NOTA: O efeito antitumoral do L-carvone foi avaliado utilizando o modelo de carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os animais tratados com água (VEH), L-carvone, MTX ou a combinação entre eles tiveram o volume tumoral avaliado entre os dias 7 e 21 de tratamento (A). Após a eutanásia, o volume (B) e o peso (C) dos tumores coletados estão representados nos gráficos. O * representa $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao veículo.

5.8.2 Parâmetros hematológicos e peso dos órgãos

O sangue coletado ao final do 21º dia foi utilizado para a análise de parâmetros hematológicos (TABELA 1). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros hematológicos analisados. A análise de leucócitos não evidenciou a presença de inflamação, bem como não houveram alterações nas enzimas hepáticas, indicando que o composto testado não apresentou toxicidade para o órgão. Isto foi confirmado através da análise histológica do fígado dos animais, na qual não foram observadas diferenças entre os grupos.

TABELA 1 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SANGUE

Parâmetro	Grupos			
	Veículo	L-carvone	L-carv + MTX	MTX
Leucócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	4,82 \pm 3,18	5,61 \pm 1,65	6,94 \pm 1,66	6,14 \pm 1,62
Linfócitos	58,26 \pm 15,36	63,07 \pm 9,09	63,95 \pm 6,65	62,44 \pm 7,50
Monócitos	4,82 \pm 1,82	5,9 \pm 1,33	5,11 \pm 0,75	5,98 \pm 1,76
Granulócitos	36,92 \pm 13,65	31,02 \pm 7,94	30,92 \pm 6,04	31,57 \pm 6,30
ALT (U.L ⁻¹)	45 \pm 9,55	47,86 \pm 15,80	39,94 \pm 17,24	46,53 \pm 21,57
AST (U.L ⁻¹)	582,72 \pm 119,34	424,10 \pm 74,80	450,21 \pm 212,83	461,5 \pm 219,67
Hemoglobina	12,88 \pm 0,24	13,21 \pm 0,08	13,05 \pm 0,37	13,04 \pm 0,55
Globulina (U.L ⁻¹)	3,06 \pm 0,58	3,28 \pm 0,73	2,74 \pm 0,33	3,084 \pm 0,48
Hemácias	9,45 \pm 0,19	9,36 \pm 0,27	9,57 \pm 0,37	9,30 \pm 0,51

NOTA: Os dados representam a média \pm desvio padrão com n = 7. ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; MTX – Metotrexato. Não foram observadas diferenças significativas.

Ao contrário de alguns agentes antineoplásicos, o L-carvone não provocou alterações hematológicas nos animais, mantendo valores dentro da faixa de referência para a hemoglobina e hemácias em camundongos. Também não foram observadas diferenças significativas na massa corporal e no peso relativo dos órgãos dos animais ao longo do tratamento (TABELA 2), assim como não houve alterações comportamentais nos animais que indicassem que o monoterpene alterou a fisiologia.

TABELA 2 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS E MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS VEÍCULO E TRATADOS COM L-CARVONE

Órgão	Grupos			
	Veículo	L-carvone	L-carv + MTX	MTX
Massa corporal	26,05 \pm 2,40	26,54 \pm 2,16	26,11 \pm 1,73	27,11 \pm 2,03
Fígado	5,60 \pm 0,62	5,55 \pm 0,38	4,80 \pm 0,62	5,47 \pm 0,41
Rins	1,34 \pm 0,14	1,26 \pm 0,095	1,13 \pm 0,15	1,20 \pm 0,09
Baço	0,95 \pm 0,21	1,14 \pm 0,29	0,81 \pm 0,22	0,85 \pm 0,28
Pulmões	0,72 \pm 0,05	0,76 \pm 0,05	0,71 \pm 0,06	0,74 \pm 0,06

5.8.3 Análise histológica

A avaliação histológica dos tumores foi realizada com o objetivo de visualizar possíveis alterações decorrentes dos tratamentos (FIGURA 20). Os tumores foram

analisados quanto a presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose, de acordo com a seguinte classificação: 0 – ausente; I – até 25% da área tumoral; II – de 25% a 50% da área total; III – entre 51% e 75% da área; IV – mais do que 75% da área tumoral.

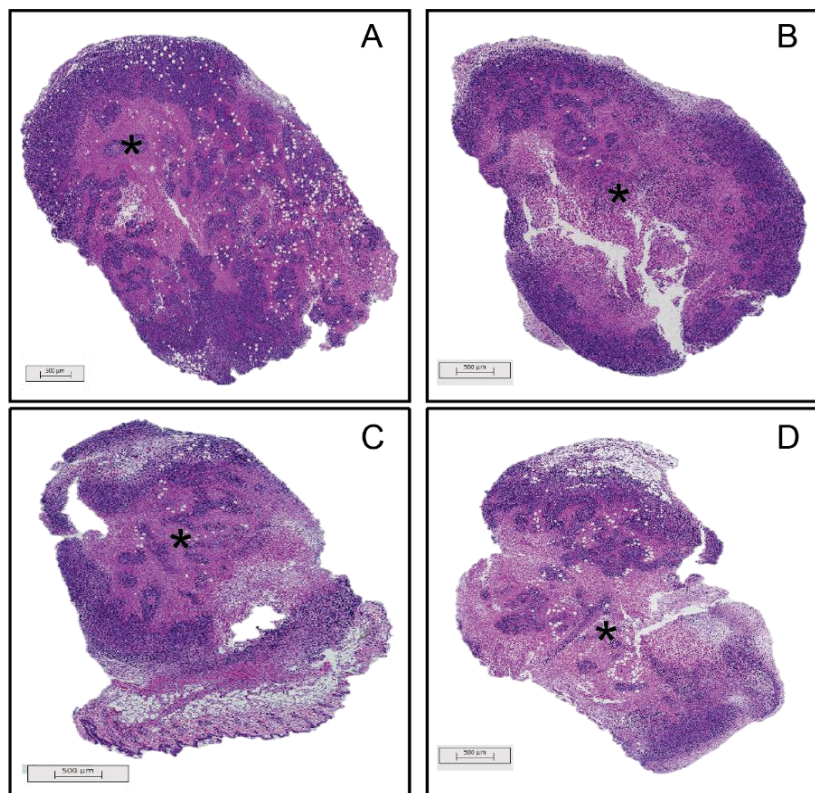
A partir da análise dos cortes histológicos, foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório periférico de leve a moderado caracterizado pela presença de células polimorfonucleares em todas as lâminas, sem diferenças entre os grupos. Quanto à necrose coagulativa, o grupo veículo apresentou maior número de amostras classificadas como grau II, o que compreende entre 26 e 50% da área tumoral. Já os grupos que receberam L-carvone sozinho ou combinado com a dose reduzida de MTX tiveram a maior parte dos tumores classificados como grau III (51 – 75% da área), indicando a maior ocorrência de necrose nestes animais quando comparados ao veículo. Um padrão similar foi observado para os animais tratados com MTX (TABELA 3).

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES

Necrose coagulativa	Grupos			
	Veículo	L-carvone	L-carvone + MTX	MTX
Grau 0 (ausente)	-	-	-	-
Grau I (0 - 25%)	-	-	-	-
Grau II (26 - 50%)	+++	+	+	+
Grau III (51 - 75%)	+	+++	+++	+++
Grau IV (76 - 100%)	+	+	-	-

NOTA: Foram avaliadas as lâminas histológicas de 5 animais de cada grupo, classificando-as quanto a área de necrose em relação a área tumoral total. Cada + representa um animal avaliado.

FIGURA 20 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TUMORES

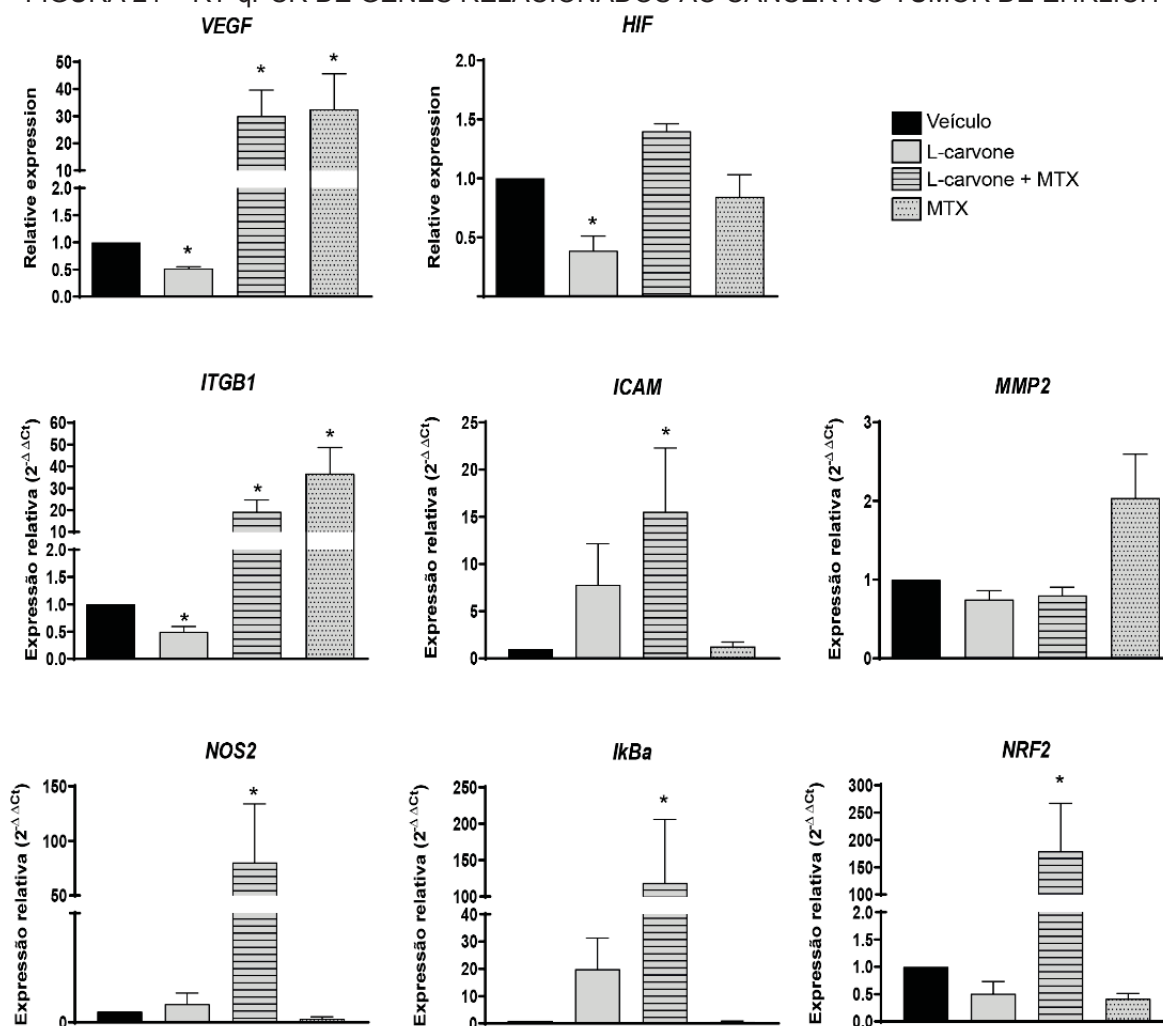


NOTA: Micrografias de cortes histológicos do tumor de Ehrlich. Coloração com hematoxilina e eosina. As figuras representam os tumores de animais do grupo veículo (A) e tratados com L-carvone 25 mg/kg (B), L-carvone 25 mg/kg combinado com 1,5 mg/kg de MTX (C) e o controle negativo MTX 2,5 mg/kg (D). Os * representam zonas de necrose coagulativa.

5.8.4 Avaliação da expressão gênica nos tumores

A expressão gênica nos tecidos tumorais coletados foi realizada com o objetivo de elucidar as possíveis vias responsáveis pelo efeito antitumoral observado. Foram avaliados genes de diversas vias moleculares: apoptose (*Casp8*, *Bax*, *Bcl2*); necroptose (*RIPK1* e *RIPK3*); inflamação (*ICAM*, *NOS2*, *IκBa*); vias de transdução de sinal (*PIK3CA*); antioxidantes (*NFE2L2*); angiogênese (*VEGF* e *HIF*) (FIGURA 21).

FIGURA 21 – RT-qPCR DE GENES RELACIONADOS AO CÂNCER NO TUMOR DE EHRlich



NOTA: A análise de expressão gênica foi realizada por RT-qPCR utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os gráficos representam a expressão gênica relativa para os diferentes tratamentos. O * representa $p < 0,05$ em relação ao controle. *VEGF* – Fator de crescimento vascular endotelial; *HIF* – Fator induzido por hipóxia; *ITGB1* – Integrina $\beta 1$; *ICAM* – Molécula de adesão Intercelular; *MMP2* – Metaloproteinase de matriz 2; *NOS2* – Óxido nítrico sintetase 2; *IκBa* – Inibidor de NF-κB; *NRF2* – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2. O * indica $p < 0,05$.

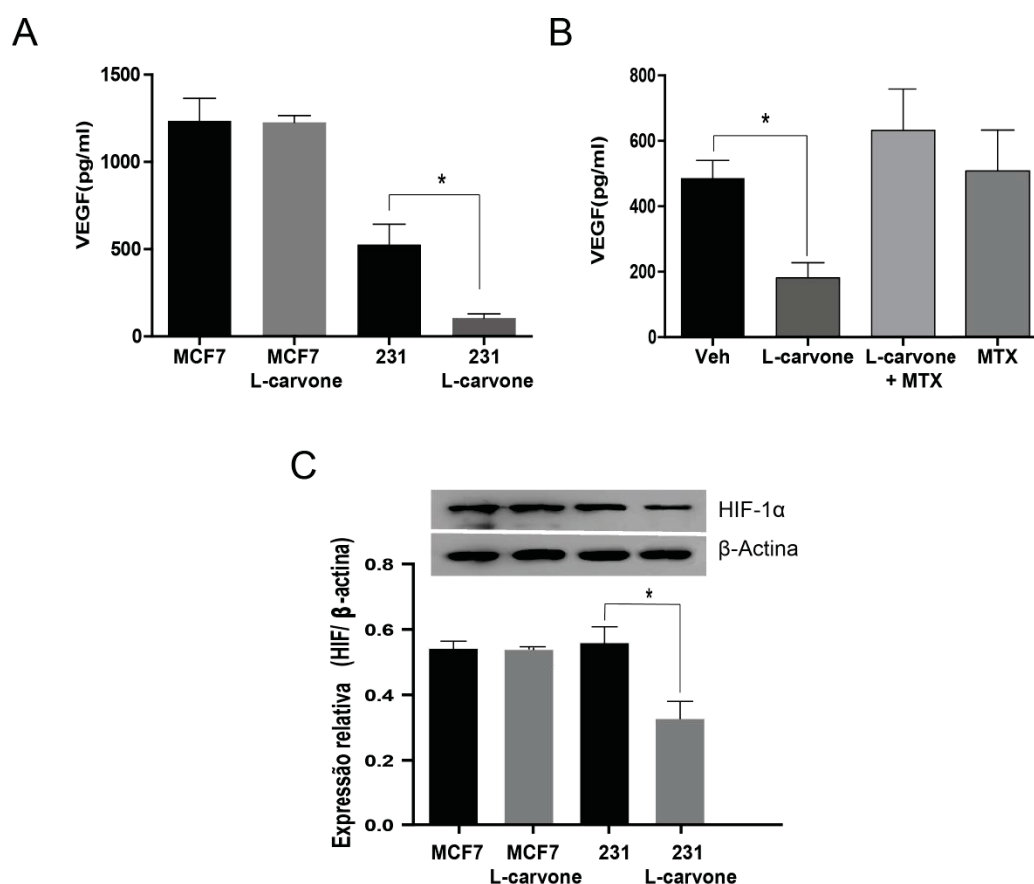
O tratamento com L-carvone 25 mg/kg provocou a alteração na expressão de *ITGB1*, o que sugere que a regulação negativa deste receptor observada *in vitro* pode também estar ocorrendo nos tumores dos animais tratados. Ainda, foi observada a diminuição da expressão de *VEGF* e *HIF*, duas moléculas importantes para a ativação da angiogênese. É importante ressaltar que diversos genes apresentaram resultados contrastantes entre os grupos L-carvone e da combinação com MTX, principalmente aqueles relacionados a angiogênese e a adesão (integrina e ICAM). Isto sugere que, embora os resultados de inibição tumoral sejam similares entre os tratamentos, as vias moleculares envolvidas podem ser diferentes. A

avaliação de genes pró e anti-apoptóticos (*BAX*, *BCL2* e *CASP8*) e de vias de necroptose (*RIPK1* e *RIPK3*) não demonstraram diferenças significativas entre animais tratados e veículos.

5.9 AVALIAÇÃO DE SINAIS PRÓ-ANGIOGÊNICOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

A expansão tumoral através da angiogênese é uma etapa limitante para o crescimento de tumores, podendo estar relacionada ao efeito antitumoral do composto testado. Os resultados anteriores evidenciaram que o L-carvone promoveu a diminuição da expressão gênica de *VEGF* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ainda, a análise histológica demonstrou que animais tratados com L-carvone tiveram um aumento na área de necrose, o que também pode estar relacionado a insuficiência circulatória e hipóxia. Desta forma, buscou-se quantificar a presença de VEGF nas linhagens e nos tumores tratados com L-carvone (FIGURA 22).

FIGURA 22 – QUANTIFICAÇÃO DE VEGF POR ELISA E IMUNODETECÇÃO DE HIF



NOTA: A quantificação de VEGF foi realizada por ELISA utilizando o sobrenadante condicionado de células expostas ou não a L-carvone (A) e o homogenato dos tumores (B). Os gráficos representam a concentração proteica em pg/ml. Estas mesmas células foram utilizadas para a imunodeteção de

fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α) (C). A intensidade de banda foi avaliada através do software ImageJ. O * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

A quantificação de VEGF mostrou que o L-carvone promoveu a diminuição desta proteína na linhagem MDAMB-231, mas não na MCF7 (FIGURA 22A). Estes dados estão de acordo com a expressão gênica, que também foi diminuída apenas na linhagem triplo-negativa. Nos tumores de Ehrlich, a concentração de VEGF também seguiu um padrão semelhante ao observado na expressão gênica, com uma redução significativa no grupo L-carvone quando comparado ao controle e ao grupo tratado com a combinação com o MTX (FIGURA 22B).

Diante destes resultados, e tendo em vista que o fator induzido por hipóxia (HIF-1) é o principal fator de transcrição que ativa *VEGF* durante a angiogênese, a presença desta proteína foi avaliada por *western blotting* (FIGURA 22C). Foi observada a redução deste fator de transcrição apenas na linhagem MDAMB-231 exposta ao L-carvone por 48 horas, enquanto que na MCF7 não houve alteração. Em conjunto, estes resultados permitem concluir que o L-carvone possui efeito sobre a sinalização para a angiogênese e que este efeito está relacionado ao aumento da necrose pela inibição da via HIF/VEGF.

6 DISCUSSÃO

A identificação de novos fármacos direcionados ao tratamento das metástases é urgente, especialmente se considerarmos como alvo o câncer de mama, que é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e que não existe tratamentos eficientes para esse estágio da doença (ANDERSON *et al.*, 2019). O presente estudo buscou investigar os efeitos antitumorais do L-carvone sobre o câncer de mama *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de elucidar seu mecanismo de ação.

Recentemente, Patel e Thakkar (2014) relataram que o L-carvone é capaz de inibir a proliferação e a migração em linhagens tumorais de mama. Este estudo sugere que o L-carvone induz danos ao DNA e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), levando a uma regulação positiva de p53 e de caspase-3 clivada que resultam em apoptose (PATEL; THAKKAR, 2014). A indução da apoptose pela via extrínseca também foi observada em linhagens celulares de câncer de cólon humano expostas ao L-carvone (VINOTHKUMAR; NALINI, 2013). Os resultados do presente trabalho demonstraram um efeito citotóxico de L-carvone nas linhagens MCF7 e MDAMB-231 de câncer de mama, concentração e tempo-dependente, com valores de IC50 de 670,8 nM e 550,2 nM, respectivamente (FIGURA 6 e 7). Esses valores são expressivamente menores do que os determinados por Patel e Thakkar (2014), que indicaram o IC50 como 1,2 µM e 1 µM. Neste trabalho, concentrações próximas a estas também foram testadas, contudo, as células mostraram uma extensiva morte celular e alterações morfológicas muito agressivas, não adequadas para a execução experimental que se desejava no presente trabalho (dados não mostrados). Essas diferenças possivelmente se devem a preparação da solução de L-carvone, uma vez que os monoterpenos geralmente são insolúveis em água (LI; PERDUE, 1998).

Na avaliação do ciclo celular, foi possível observar que L-carvone induziu a parada do ciclo na fase G2/M, com uma menor população de células na fase S (FIGURA 8). Esses dados também contrastaram com os de Patel e Thakkar (2014), que relataram parada do ciclo celular na fase S. Entretanto, efeitos semelhantes sobre o ciclo celular já foram descritos para outras moléculas derivadas de plantas, como geraniol extraído principalmente de rosas (QI *et al.*, 2018). Desta forma, pode-se demonstrar que o L-carvone possui atividades citotóxicas e antiproliferativas nas linhagens tumorais de mama *in vitro*.

Como o mecanismo de morte celular desencadeado pelo L-carvone nas linhagens MCF7 e MDAMB-231 já foram descritos por Patel e Thakkar (2014), neste trabalho buscou-se avaliar as alterações morfológicas induzidas por este composto, bem como seu efeito sobre processos relacionados a metástase. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou efeitos contrastantes entre as linhagens estudadas (FIGURA 9). Para a MCF7, foi observada a formação de agregados celulares em resposta ao tratamento, efeito este, possivelmente relacionado a expressão elevada de E-caderina nesta linhagem, o que confere a MCF7 um fenótipo epitelial (MBALAVIELE *et al.*, 1996; CHEKHUN *et al.*, 2013). No entanto, a avaliação desta proteína por *western blotting* e imunofluorescência evidenciou que a expressão deste marcador permaneceu inalterada após o tratamento com L-carvone, mesmo sendo observado nestas células o aumento da transcrição deste gene, indicando que este efeito não está diretamente relacionado a regulação da E-caderina nestas células (FIGURA 15).

A partir da marcação dos microfilamentos de actina, foi possível evidenciar que o L-carvone não apenas provocou o aumento da proporção núcleo:citoplasma, diminuindo a capacidade de expansão do corpo celular, mas também interferindo na formação das fibras de estresse do citoesqueleto (FIGURA 10). As fibras de estresse consistem da presença de F-actina associada a outras proteínas, como a miosina II e a α -actinina, geralmente ligadas aos pontos de contato focal através de suas extremidades (BURRIDGE; GUILLUY, 2016). A formação de fibras de actina tensionadas já foram relacionadas ao enrijecimento da célula necessário durante a invasão tecidual, além de promover a proliferação de células tumorais de mama através do aumento da atividade de Src (TAVARES *et al.*, 2017). Uma vez desestabilizadas, estas fibras não permitem a organização e desorganização constante do citoesqueleto necessária para a mobilidade da célula. Havaki *et al.* (2007) demonstraram que essas estruturas se encontram melhor organizadas em células de tumores primários de mama quando comparadas às células epiteliais normais do mesmo tecido. Além disso, estes autores demonstraram que a reorganização do citoesqueleto nestas células ocorre devido a alterações na adesão celular mediada por integrinas $\alpha\beta3$.

Durante a disseminação metastática, a migração celular, a adesão das células aos componentes da MEC e a invasão nos tecidos circundantes são etapas críticas, e, portanto, uma diminuição desses processos pode contribuir para a prevenção da

disseminação do câncer a partir do local de origem (HAMIDI; IVASKA, 2018). Diante disso, foi avaliado o efeito do tratamento com 100 nM de L-carvone por 48 horas sobre estas dinâmicas celulares nas linhagens MCF7 e MDAMB-231. A avaliação da migração celular pelo método do *wound healing* mostrou um efeito inibitório de 33,1% e 38% após 24 e 48 horas, respectivamente, para a linhagem MDAMB-231 exposta ao composto. Para a linhagem MCF7, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre a migração de células tratadas e não tratadas, considerando o perfil pouco migratório da linhagem (FIGURA 12). Para o ensaio de adesão, os resultados demonstraram que as células expostas ao L-carvone apresentaram uma menor adesão ao colágeno tipo I e a laminina, mas não à fibronectina (FIGURA 11). Este resultado é surpreendente, uma vez que a fibronectina já é descrita como um potente indutor de malignidade pela ativação da expressão de proteínas pró-metastáticas, como a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) (PEREIRA *et al.*, 2014).

Foi possível observar também que a linhagem MDAMB-231 apresentou maior adesão às proteínas da MEC em relação a MCF7, o que está de acordo com Rizwan *et al.* (2015), que relatou uma correlação positiva entre o potencial metastático e a adesão ao colágeno I utilizando diversas linhagens tumorais de mama. Neste mesmo estudo, ele demonstrou que as células triplo-negativas, como a MDAMB-231, apresentam expressão elevada de integrina $\beta 1$, um receptor de membrana que desempenha função de adesão aos ligantes extracelulares, o que não acontece nas linhagens luminais, por exemplo.

Considerando que a MDAMB-231 mostrou-se particularmente afetada pela ação do L-carvone, e que a interação célula-MEC se mostrou alterada, a próxima etapa do trabalho consistiu na avaliação da expressão de integrina $\beta 1$. O tratamento com L-carvone provocou a diminuição da expressão deste receptor tanto a nível de RNAm (FIGURA 14), quanto proteico, além de uma menor presença de *clusters* de integrina na membrana da MCF7 tratada (FIGURAS 16 e 17A). Outros estudos também implicam as integrinas como componentes importantes na tumorigênese mamárias. Para a MDAMB-231, o nocaute da integrina $\beta 1$ diminuiu a proliferação celular e induziu esta célula a apoptose, suprimindo a via de sinalização para sobrevivência PI3K/Akt e reduzindo a angiogênese (MITCHELL *et al.*, 2010). Ademais, altos níveis deste receptor têm sido relacionados à resistência a múltiplas drogas, principalmente porque a via de sinalização de sobrevivência celular mediada por $\beta 1$ compartilha elementos comuns com as vias clássicas de indução de tumor.

Por exemplo, a superexpressão de $\beta 1$ contorna os efeitos do trastuzumabe, o anticorpo monoclonal direcionado ao receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2), ativando um sinal de proliferação extracelular independente deste receptor (LESNIAK *et al.*, 2009). Nesse cenário, tratamentos que combinam medicamentos anti-HER-2 e anti- $\beta 1$ estão sendo propostos como uma maneira de otimizar o tratamento do câncer de mama (BLANDIN *et al.*, 2015).

Os efeitos antitumorais decorrentes da perda de adesão podem acontecer não somente pela inibição das integrinas, mas também pela regulação da via de transdução de sinal à jusante mediada por FAK. Quando superexpresso, FAK ativa um sinal de proliferação sustentado via PI3K/Akt, estimula a produção de MMPs e está relacionado aos piores prognósticos no câncer (GOLUBOVSKAYA, 2011; RIGIRACCILO *et al.*, 2019). Os resultados demonstraram que o L-carvone foi capaz de diminuir a forma ativa desta proteína, sem alterar os níveis totais de FAK nas células (FIGURA 17B). Outros estudos já relataram que o bloqueio de Y397-pFAK provoca atrasos na migração trans-endotelial das células tumorais de mama, inibindo seu intravasamento durante a metástase (EARLEY; PLOPPER, 2008).

Outro evento da metástase modulado pelo tratamento com L-carvone foi a invasão, avaliada através da capacidade das células de degradar o matrigel e atravessar as membranas do *transwell*. A inibição da invasão foi observada para células MDAMB-231 expostas a 250 nM de L-carvone por 48 horas, mas não para 100 nM (FIGURA 13). Esse resultado demonstra que, embora a dose mínima de 100 nM já seja eficiente para inibir as vias de transdução de sinal, ainda não o é para promover a invasão total das células em uma superfície.

A invasão do tecido adjacente ao tumor, estimulado pela FAK ou diversos outros fatores, depende da destruição da MEC, que é catalisada principalmente pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) (CONLON; MURRAY, 2019). A metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) é secretada pelas células e armazenada no ambiente extracelular como zimogênio, até que seja ativada pela clivagem do domínio pró-peptídeo. Essa proteína é uma das principais responsáveis pela disseminação das células tumorais além da membrana basal, pois ela tem como substrato o colágeno IV, o mais abundante nesta camada, além de degradar elastina e fibronectina da MEC (DUFFY *et al.*, 2000; KOBUSIAK-PROKOPOWICZ *et al.*, 2018).

Pesquisas recentes evidenciam o papel da interação de FAK e MMP-2 na progressão tumoral. Sen *et al.* (2015) demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha 5 \beta 1$ inibe a invasão celular, pois a sinalização por FAK é importante para a produção de MMP-2. Nos últimos anos, funções das MMPs além da degradação da MEC vêm sendo estudadas. Por exemplo, a utilização de um inibidor de MMPs de espectro amplo (GM6001) tem como resultados a perda da estabilidade do citoesqueleto e da estrutura celular pela diminuição de integrinas, além da inibição da fosforilação de FAK em linhagens mamárias (DAS *et al.*, 2017). Dados obtidos no presente estudo demonstraram que o L-carvone inibe MMP-2 em diversos níveis: RNAm, expressão proteica e atividade gelatinolítica (FIGURA 18). Das *et al.* (2017) sugerem ainda que a expressão simultânea de integrina $\beta 1$ e MMP-2 é necessária para a manutenção de um fenótipo invasivo via sinalização por FAK, o que explica a diminuição da invasão observada nas células tratadas com L-carvone, onde estas moléculas estão reduzidas.

O potencial antitumoral do L-carvone também foi avaliado *in vivo* utilizando o modelo tumoral mamário de Ehrlich em camundongos. Foi observada uma diminuição no volume e peso dos tumores dos animais que receberam apenas L-carvone e também quando associado ao quimioterápico MTX. A partir do 11º dia não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com L-carvone e com o MTX, indicando não apenas que a molécula desempenha atividade antitumoral, mas sobretudo que foi capaz de potencializar o efeito do quimioterápico (FIGURA 19). A quimioterapia tradicional para o câncer de mama é frequentemente associada a sintomas debilitantes tais como fadiga, neuropatia periférica, citopenia e alopecia, além de efeitos colaterais a longo prazo, como cardiomiopatia, que podem ser bastante debilitantes ao paciente (TAO; VISVANATHAN; WOLFF, 2015).

Há relatos anteriores ao uso de compostos naturais com o objetivo de sensibilizar o tumor de Ehrlich ao paclitaxel e ao metotrexato, por exemplo, o que reforça o uso de adjuvantes à quimioterapia como forma de reduzir esses efeitos colaterais indesejados associados ao tratamento do câncer (ELSISY *et al.*, 2017; GHONEUM *et al.*, 2019). É importante ressaltar ainda que o monoterpeno testado não provocou alterações fisiológicas nos animais, uma vez que não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos do sangue e enzimas hepáticas, no peso corporal ao longo do tratamento de 21 dias, no peso relativo dos órgãos e na análise histológica do fígado dos animais tratados ou não. Já para a análise da

histologia dos tumores, foi evidenciado um maior grau de necrose coagulativa nos tumores do grupo L-carvone 25 mg/kg quando comparados ao controle (FIGURA 20). Análises da expressão gênica nos tecidos tumorais apoiam a hipótese de necrose como principal evento relacionado ao efeito antitumoral observado, uma vez que genes relacionados aos processos inflamatórios, a apoptose e a necroptose não se mostraram alterados (FIGURA 21).

A análise da expressão gênica também demonstrou a diminuição na expressão de integrina $\beta 1$ nos animais do grupo L-carvone, assim como observado *in vitro*. Halling *et al.* (2015) demonstraram que o nocaute deste receptor e a inibição de FAK potencializaram o efeito citotóxico da cisplatina contra uma linhagem de Ehrlich resistente a múltiplos fármacos. Estes autores relatam que as células tumorais que estão mais fortemente ancoradas ao tecido que envolve o tumor, principalmente através da superexpressão de $\beta 1$, são mais resistentes à morte celular por anoikis. Uma diminuição no sinal de proliferação mediada por este receptor poderia explicar parcialmente a redução no volume e no peso do tumor observados em animais que foram tratados com L-carvone. Além disso, a regulação negativa de $\beta 1$ pode sensibilizar parcialmente as células ao efeito do metotrexato, o que explica a eficácia aprimorada do MTX em doses mais baixas quando combinado ao L-carvone.

Por último, buscou-se compreender o aumento da necrose no grupo L-carvone e o efeito deste composto sobre as vias de sinalização angiogênica. A principal causa da formação de centros necróticos em tumores é a falta de suprimento sanguíneo e de nutrientes ocasionado pela rápida proliferação celular. Nesta condição, ocorre a ativação de fatores pró-angiogênicos, como o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), que ativa a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e resulta na formação de novos vasos (EALES; HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016). O HIF-1 é regulado positivamente em vários tipos de câncer, nos quais ativa uma ampla variedade de vias moleculares relacionadas à resistência e a apoptose, resposta anti-inflamatória, metástase e angiogênese (SEMENZA, 2003). Em resposta ao HIF-1, o VEGF produzido se liga ao seu receptor específico VEGFR2, presente nas células endoteliais vasculares, estimulando a expansão dos vasos sanguíneos e promovendo o crescimento do tumor (CAO *et al.*, 2009). Os resultados deste trabalho demonstraram a supressão de HIF-1 α e VEGF *in vitro* e *in vivo* em resposta ao tratamento com L-carvone, tanto a nível de transcrição do gene

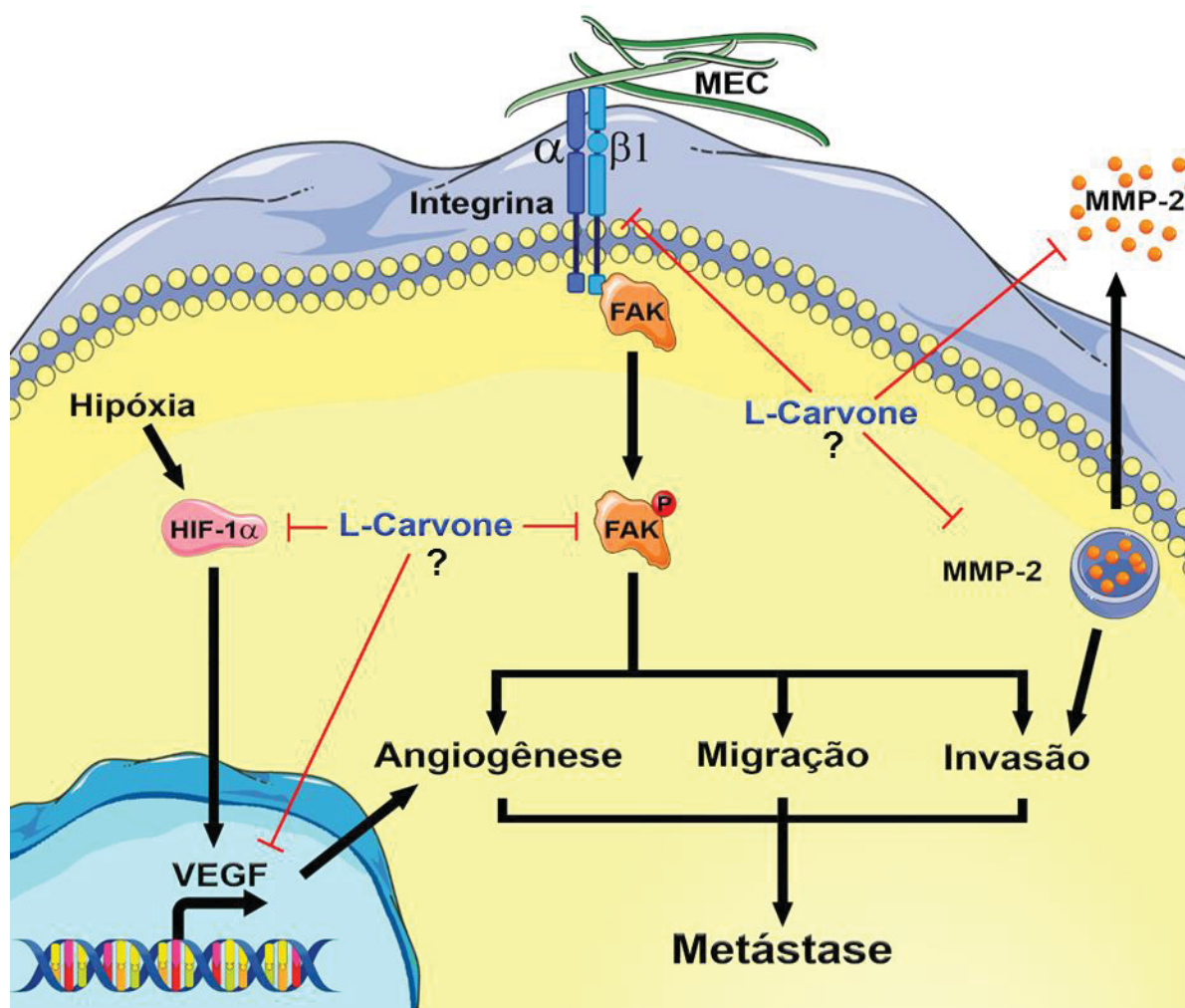
quanto da proteína (FIGURA 22). Efeitos semelhantes foram relatados para gliomas (JENSEN *et al.*, 2006), tumores colorretais (CAO *et al.*, 2009) e câncer de mama (KIM *et al.*, 2017), que relacionam os efeitos antitumorais observados à inibição da angiogênese. Tang *et al.* (2004) demonstraram que o nocaute de *HIF-1α* em células endoteliais levou ao aumento de zonas necróticas em modelo de carcinoma pulmonar de Lewis. Ainda, foi observada uma diminuição da formação de vasos, além da inibição da proliferação, da migração e da invasão mediada por VEGF, o que reforça que esta via influencia não apenas na vascularização, mas também em outros processos tumorigênicos (TANG *et al.*, 2004). Vale ressaltar que, apesar do aumento da necrose ser considerado um marcador para piores prognósticos, o uso de drogas anti-VEGF já são propostos para determinados tipos neoplásicos em associação com a quimioterapia ou radioterapia, entretanto, sua eficácia ainda permanece controversa (RIBATTI, 2016).

Diante dos resultados obtidos, o monoterpeno L-carvone apresentou efeitos anti-neoplásicos importantes em tumores de mama *in vitro* e *in vivo*, regulando a interação células-matriz, inibindo a migração celular e suprimindo a sinalização pró-angiogênese, além de aumentar a eficácia da quimioterapia no modelo *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

O monoterpeneo L-carvone apresenta efeitos antitumorais nas linhagens tumorais de mama e no modelo de tumor mamário murino, regulando: a adesão célula-matriz, através da inibição da integrina $\beta 1$ e da sinalização por FAK; a invasão, regulando negativamente a proteína MMP-2; e a angiogênese, através da repressão da via HIF-1/VEGF, além de aumentar a eficácia da quimioterapia e provocar a diminuição do tamanho e peso de tumores sólidos (FIGURA 23). Ademais, este trabalho é o primeiro relato na literatura da utilização deste composto em modelos de câncer de mama *in vivo*.

FIGURA 23 – MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA O L-CARVONE NAS CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA



FONTE: O autor (2019).

Nota: A figura representa a hipótese proposta neste trabalho para o mecanismo de ação do L-carvone sobre o câncer de mama e seu efeito antimetastático. O L-

carvone atuou inibindo a via angiogênicas HIF-1 α /VEGF, inibindo a expressão de integrina β 1 e a ativação da sinalização por FAK, bem como diminuindo a expressão e a atividade de MMP-2, resultando na inibição da angiogênese, migração e invasão celular. Ainda, estes efeitos demonstraram-se mais efetivos contra o subtipo mais agressivo de câncer de mama (TNBC, triplo-negativo).

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, K. K. et al. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 59–63, 2002.

AKSORN, N; CHANVORACHOTE, P. Integrin as a Molecular Target for Anti-cancer Approaches in Lung Cancer. **Anticancer Research**, v. 548, p. 541–548, 2019.

AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 679–692, 2012.

AL-RAAWI, D. et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 4, n. 4, p. 265–275, 2011.

ANDERSON, R. L. et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 185–204, 2019.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **Ecancermedicalsecience**, v. 10, p. 1–25, 2016.

AUNG, T. N. et al. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 656, 2017.

BLANDIN, A. F. et al. β 1 Integrins As Therapeutic Targets To Disrupt Hallmarks of Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. p. 394–424, 2018.

BURRIDGE, K.; GUILLUY, C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. **Experimental Cell Research**, v. 343, n. 1, p. 14–20, 2016.

CALDARELLA, A. et al. Invasive breast cancer: A significant correlation between histological types and molecular subgroups. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, n. 4, p. 617–623, 2013.

CAO, D. et al. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: Association with clinical outcomes and prognostic implications. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1–9, 2009.

CARNESECCHI, S. et al. Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 301, n. 2, p. 625–30, 2002.

CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. **Genes and Diseases**,

v. 2, n. 1, p. 26–34, 2015.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer. **Science**, v. 331, n. March, p. 1559–1565, 2011.

CHEANG, MCU; MARTIN, M; NIELSEN, TO; PRAT, A; VODUC, D.; RUIZ, A; CHIA, S; SHEPERD, L. Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. **The Oncologist**, v. 20, p. 474–482, 2015.

CHEKHUN, S. et al. Expression of Biomarkers Related to Cell Adhesion, Metastasis and Invasion Breast Cancer Cell Lines. **Experimental Oncology**, v. 35, p. 174–179, 2013.

CHEN, T. C. et al. Induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in multiple myeloma cells by NEO214, perillyl alcohol conjugated to rolipram. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

CHEN, T. C.; DA FONSECA, C. O.; SCHÖNTHAL, A. H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1580–1593, 2015.

CHO, M. et al. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 5, p. 1772–1782, 2016.

CONLON, G. A.; MURRAY, G. I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 629–640, 2019.

DAS, A. et al. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

DAWOOD, S. et al. International expert panel on inflammatory breast cancer: Consensus statement for standardized diagnosis and treatment. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 515–523, 2011.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 413–422, 2006.

DE SOUSA, DAMIÃO PERGENTINO; NÓBREGA, FRANKLIN FERREIRA DE FARIAS; ALMEIDA, R. N. Influence of the Chirality of (R)-(-)-and (S)-(+)-carvone in the Central Nervous System: A Comparative Study. **Z. Naturforsch**, v. 268, n. February, p. 264–268, 2007.

DING, X.; CHEN, H. Anticancer effects of Carvone in myeloma cells is mediated through the inhibition of p38 MAPK signalling pathway , ap - optosis induction and inhibition of cell invasion. **JBUON**, v. 23, n. 3, p. 747–751, 2018.

DUFFY, M. J. et al. Metalloproteinases: Role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 252–257, 2000.

DUNCAN, R. E. et al. Geraniol and β -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1739–1747, 2004.

EALES, K. L.; HOLLINSHEAD, K. E. R.; TENNANT, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e190–e190, 2016.

EARLEY, S.; PLOPPER, G. E. Phosphorylation of focal adhesion kinase promotes extravasation of breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 2, p. 476–482, 2008.

ELSISY, M. K. et al. Cancer Medicine & Anti Cancer Drug The Antitumor Potential of Quercetin on Solid Ehrlich Tumor in Female Mice. **Cancer Medicine & Anti Cancer Drug**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2017.

FENG, Y. et al. ScienceDirect Breast cancer development and progression : Risk factors , cancer stem cells , signaling pathways , genomics , and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

GALLE, M. et al. Suppression by geraniol of the growth of A549 human lung adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and in vivo: Potential use in cancer chemotherapy. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 5, p. 888–895, 2014.

GAO, Y.; HONZATKO, R. B.; PETERS, R. J. Terpenoid synthase structures: A so far incomplete view of complex catalysis. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 10, p. 1153–1175, 2012.

GHONEUM, M. et al. Dietary baker's yeast sensitizes Ehrlich mammary adenocarcinoma to paclitaxel in mice bearing tumor. **Oncology Reports**, v. 6, n. 19, p. 3155–3166, 2019.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 159, p.109-113, 1986.

GONÇALVES, J. C. R. et al. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 5, p. 1017–1020, 2008.

GOPALAKRISHNAN, T. et al. Preventive effect of D-carvone during DMBA induced mouse skin tumorigenesis by modulating xenobiotic metabolism and induction of apoptotic events. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 178–187, 2019.

GOTTESMAN, M. M. et al. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. **Reviews in Advance**, v. 56, n. 20, p. 1–18, 2015.

GUAN, J. Integrin Signaling Through FAK in the Regulation of Mammary Stem Cells and Breast Cancer. **IUBMB Life**, v. 62, n. 4, p. 268–276, 2010.

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Breast Cancer Benign Breast Diseases : Classification , Diagnosis , and Management. **The Oncologist**, p. 435–449, 2006.

HALLING, B. et al. Chemoresistance in Mouse Ehrlich Carcinoma Cells. p. 111–132, 2015.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, p. 1–16, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAVAKI, S. et al. Altered expression pattern of integrin alphavbeta3 correlates with actin cytoskeleton in primary cultures of human breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 7, p. 1–13, 2007.

HO, H. Carvone and less volatile analogues as repellent and deterrent antifeedants against the pine weevil *Hylobius abietis*. **JEN Berlin**, v. 128, p. 610–619, 2004.

HOWAT, S. et al. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. **New Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 242–245, 2014.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. **Estimativa 2018-2019 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 2019.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics: 2011. **CA Cancer J Clin**, v. 49, n. 2, p. 1,33-64, 1999.

JENSEN, R. L. et al. Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 78, p. 233–247, 2006.

KATO, H. et al. The Primacy of β 1 Integrin Activation in the Metastatic Cascade. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the tumor. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KIM, D. H. et al. HS-1793, a resveratrol analogue, downregulates the expression of hypoxia-induced HIF-1 and VEGF and inhibits tumor growth of human breast cancer cells in a nude mouse xenograft model. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 2, p. 715–723, 2017.

KIM, S. H. et al. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 407, n. 1, p. 129–134, 2011.

KOBUSIAK-PROKOPOWICZ, M. et al. MMP-2 and TIMP-2 in patients with heart failure and chronic kidney disease. **Open Med.**, v. 13, p. 237–246, 2018.

KÖHRMANN, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1–20, 2009.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T. Essential oils of spearmint (Carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 4, p. 425–430, 1995.

KOYAMA, M. et al. Perillyl alcohol causes G1 arrest through p15INK4b and p21 WAF1/Cip1 induction. **Oncology Reports**, v. 29, n. 2, p. 779–784, 2013.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017..

LAWSON, C.; SCHLAEPFER, D. D. Phocal adhesion kinase regulation is on a FERM foundation. **Journal of Cell Biology**, v. 202, n. 6, p. 833–836, 2013.

LEGATE, K. R.; WICKSTRÖM, S. A.; FÄSSLER, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. **Genes & Development**, v. 23, p. 397–418, 2009.

LESNIAK, D. et al. B1-Integrin Circumvents the Antiproliferative Effects of Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor-2-Positive Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8620–8628, 2009.

LI, H. et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5865–5870, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

M. GOLUBOVSKAYA, V. Focal Adhesion Kinase as a Cancer Therapy Target. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 735–741, 2011.

MBALAVIELE, G. et al. E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. **Cancer Research**, v. 56, n. 17, p. 4063–4070, 1996.

MCGEADY, P.; WANSLEY, D. L.; LOGAN, D. A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 7, p. 953–955, 2002.

MIGNANI, S. et al. Advances in Combination Therapies Based on Nanoparticles for Efficacious Cancer Treatment: An Analytical Report. 2014.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.

MISHRA, S. et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

MITCHELL, K. et al. Suppression of integrin $\alpha 3\beta 1$ in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6359–6367, 2010.

MITRA, SARMISTHA; DASH, R. Natural Products for the Management and Prevention of. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-9, 2018.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK – Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 516–523, 2006.

MORENO-LAYSECA, P.; STREULI, C. H. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. **Matrix Biology**, v. 34, p. 144–153, 2014.

MORO, I. J. et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 4, p. 1–8, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAMBIAR, D.; RAJAMANI, P.; SINGH, R. P. Mutation Research / Reviews in Mutation Research Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 3, p. 139–157, 2011.

NOGOCEKE, F. P. et al. Neuroscience Letters Antimanic-like effects of (R) - (-) -carvone and (S) - (+) -carvone in mice. **Neuroscience Letters**, v. 619, p. 43–48, 2016.

OH, J. K.; WEIDERPASS, E. Infection and cancer: Global distribution and burden of diseases. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 5, p. 384–392, 2014.

OLSON, T. A.; MOHANRAJ, D.; CARSON, L. F.; RAMAKRISHNAN, S. Vascular Permeability Factor Gene Expression in Normal and Neoplastic Human Ovaries. **Cancer Research**, v. 54, n. 1, p. 276–280, 1994.

PAN, B. et al. $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5412–5416, 2018.

PAN, M. et al. FAK is Required for Tumor Metastasis-Related Fluid Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 38, p. 1–16, 2019.

PATEL, P. B.; THAKKAR, V. R. L-carvone induces p53, Caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 3, p. 453–462, 2014.

PEREIRA, I. T. et al. Fibronectin affects transient MMP2 gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–7, 2014.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S26–S35, 2015.

QI, F. et al. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. **Journal of B.U.ON.**, v. 23, n. 2, p. 346–352, 2018.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Immunomodulatory Activity of Naturally Occurring Monoterpenes Carvone , Limonene , and Perillic Acid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 285–294, 2003.

REDDY, B. S. et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Research**, v. 57, n. 3, p. 420–425, 1997.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. **The Lancet**, v. 378, n. 9805, p. 1812–1823, 2011.

REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858–870, 2013.

RIBATTI, D. Tumor refractoriness to anti-VEGF therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 46668–46677, 2016.

RIGIRACCILO, D. C. et al. Focal adhesion kinase (FAK) activation by estrogens involves GPER in triple-negative breast cancer cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–16, 2019.

RIZWAN, A. et al. Breast cancer cell adhesome and degradome interact to drive metastasis. **npj Breast Cancer**, v. 1, n. September, p. 1–11, 2015.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. **Adv Pharm Bull**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421–427, 2014.

SAFE, S.; KASIAPPAN, R. Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Transcription Factors as Targets. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, 2016.

SALEHI, B. et al. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 8, p. 1425–1449, 2018.

SANDERINK, W. B. G.; MANN, R. M. Advances in breast intervention : where are we now and where should we be? **Clinical Radiology**, v. 1, n. 11, p. 1–11, 2017.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–732, 2003.

SEN, T. et al. Focal Adhesion Kinase Induces Matrix Metalloproteinase-2 by Involving $\alpha 5 \beta 1$ -Mediated Signaling in Breast Cancer Cell , MCF-7. **Acta Medica International**, v. 2, n. 1, 2015.

SIEGEL, R.; MILLER, K. D.; AHMEDIN, J. Cáncer Statistics. **Cancer Journal**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2019.

SOUZA, C. E. A. *et al.* Ruthenium complex exerts antineoplastic effects that are mediated by oxidative stress without inducing toxicity in Walker-256 tumor-bearing rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p.228-239, 2017.

SULZMAIER, F. J.; JEAN, C.; SCHLAEPFER, D. D. REVIEWS FAK in cancer : mechanistic findings and clinical applications. **Nature**, v. 33, n. August, 2014.

TANG, N. et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 485–495, 2004a.

TANG, N. et al. Loss of HIF-1 in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 12, p. 485–495, 2004.

TANJONI, I; WALSH, C; URYU, S; TOMAR, A; NAM, J; MIELGO, A; LIM, S; LIANG, C; KOENIG, M; PATEL, N; KWOK, C; MCHAMON, G; STUPACK, DG; SCHLAEPER, D. PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. **Cancer Biology & Therapy**, v. 9, n. 10, p. 764–777, 2010.

TAO, J. J.; VISVANATHAN, K.; WOLFF, A. C. Long term side effects of adjuvant

chemotherapy in patients with early breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S149–S153, 2015.

TAVARES, S. et al. Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and proliferation of pre-invasive breast cancer cells. **Nature Communications**, 2017.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

VINOTHKUMAR, R.; NALINI, N. Supplementation with D-carvone Induces Cytotoxicity and Mitochondrial Mediated Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines HT-29 and SW480. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 4, n. 2, p. 502–510, 2013.

WAKS, AGW; WINER, E. Breast Cancer Treatment A Review. **Clinical Review & Education**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017.

WATTENBERG, L. W.; SPARNINS, V. L.; BARANY, G. Inhibition of N-Nitrosodiethylamine Carcinogenesis in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds and Monoterpenes. **Cancer Research**, v. 49, n. 10, p. 2689–2692, 1989.

WOODWARD, W. A. et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3244–3248, 2003.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242–248, 2000.

YILDIRIM, E.; EMSEN, B.; KORDALI, S. Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera : Curculionidae). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, p. 198-204, 2013.

YOUNIS, Y. M. H.; BESHIR, S. M. Carvone-rich essential oils from *mentha longifolia* (L.) huds. ssp. *schimper* briq. and *mentha spicata* L. Grown in Sudan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 6, p. 539–541, 2004.

ZAIDEL-BAR, R. et al. Functional atlas of the integrin adhesome. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 8, p. 858–867, 2007.

ZENG, L.; KYPRIANOU, N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 8, p. 7-13, 2005.

ZHENG, G.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Anethofuran, carvone, and limonene: Potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. **Planta Medica**, v. 58, n. 4, p. 338–341, 1992.

ZIEMER, L. S. et al. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. **Neoplasia**, v. 3, n. 6, p. 500–508, 2001.

ANEXO I

PARES DE INICIADORES UTILIZADOS PARA A RT-qPCR
EM LINHAGENS HUMANAS

Gene	Universal (5'-3')	Reverso (5'-3')
<i>GAPDH</i>	CTGCACCACCAACTGCTTA	CATGACGGCAGGTCAGGTC
<i>HPRT</i>	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCA AAGAAT
<i>CDH1</i>	CCCGGGACAACGTTTATT	GTCGTTACGAGTCACTTCAG
<i>VIM</i>	CTCGTCACCTTCGTGAATAC	GATTAGTTTCCCTCAGGTTTCAG
<i>MMP2</i>	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	CAGGGTGCTGGCTGA GTAGAT
<i>TIMP2</i>	CGACATTTATGGCAACCCTATCA	GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
<i>MMP14</i>	GCAGAAGTTTTACGG CTTGCA	TCGAACATTGGCCTT GATCTC
<i>BAX</i>	TCCCCCGAGAGGTCTTTT	CGGCCCCAGTTGAAGTTG
<i>BCL2</i>	TTGGCCCCCGTTGCTT	GAGAACAGGGTACGATAACCG
<i>CASP8</i>	GGATGCCTTGATGTTATTCC	AGTTCCCTTTCCATCTCCTC
<i>TP53</i>	AGCTACGGTTTCCGTCTGGG	CTTGTTGAGGGCAGGGGAGT
<i>VEGF</i>	CCTATGTGCAGAGGAATTATG	CCACTGTGTTGAGGGCAATG
<i>ITGB1</i>	AATGTAACCAACCGTAGC	CAGGTCCATAAGGTAGTAGA

Concentrações utilizadas: CDH1 900 nM, enquanto os demais genes 600 nM

ANEXO II

PARES DE INICIADORES UTILIZADOS PARA A RT-qPCR DE
CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

Gene	Universal (5'-3')	Reverso (5'-3')
<i>GAPDH</i>	GGTGAAGCAGGCATCT	TGTTGAAGTCGCAGGAG
<i>RPLP0</i>	CGACCTGGAAGTCCAACTAC	ACTTGCTGCATCTGCTTG
<i>HIF</i>	ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAGTTAGG
<i>ITGB1</i>	TTGTGGAGGCAATGGCGTGTGC	ACAGACGCCAAGGCAGGTCTGA
<i>ICAM-1</i>	CAATTTCTCATGCCGCACAG	AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
<i>MMP2</i>	CAGGGAATGAGTACTGGGTCTA	ACTCCAGTTAAAGGCAGCATCTAC
<i>NOS2</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGGTTTCG
<i>IKBA</i>	GCTACCCGAGAGCGAGGAT	GCCTCCAAACACACAGTCATCAT
<i>NRF2</i>	GTGGATCCGCCAGCTACTCCCA	TGGGGATATCCAGGGCAAGCGA
<i>VEGF</i>	ACTGGACCCTGGCTTTACTGCT	TGATCCGCATGATCTGCATGGTG
<i>BAX</i>	GCCTCCTCTCCTACTTC	CCTCAGCCCATCTTCTT
<i>BCL2</i>	CACTTGCCACTGTAGAGA	GCTTCACTGCCTCCTT
<i>CASP8</i>	CCAGGAAAAGATTTGTGTCTA	GGCCTTCCTGAGTACTGTCACCTG
<i>RIPK1</i>	TCATCTAGCGGGAGGTTGGA	ATGCCCAGTAGCTTCACCAC
<i>RIPK3</i>	CCAGAGGCCACTTGTGTAGCG	CGCTTTAGAAGCCTTCAGGTTGAC

Concentrações utilizadas: 800 nM